Universidad Técnica de Ambato

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Agronomía

Desarrollo de técnicas de detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T) utilizando tres pares de primer a través de (PCR) tiempo final.

Autor:

Xiomara Monserrath Chasi Oyasa

Tutor:

Ing. Michel Leiva Mora Dr. C.

Cevallos 2024

Desarrollo de técnicas de detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T) utilizando tres pares de primer a través de (PCR) tiempo final.

REVISADO POR:

.....

Tutor: Michel Leiva Mora Dr. C.

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

FECHA

.....

PhD. PATRICIO NÚÑEZ TORRES **29/07/2024**
PRESIDENTE TRIBUNAL

.....

Ing. Mg. ZURITA VÁSQUEZ JOSÉ HERNÁN **29/07/2024**
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

29/07/2024

Ing. Mg. VALLE VELASTEGUI EDGAR LUCIANO
MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, **XIOMARA MONSERRATH CHASI OYASA**, portador de cédula de ciudadanía número: **1804417200**, libre y voluntariamente declaro que el informe final del proyecto de investigación titulado: "**Desarrollo de técnicas de detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T) utilizando tres pares de primer a través de (PCR) tiempo final.**" es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola

responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



…….

Xiomara Monserrath Chasi Oyasa

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este informe final del proyecto de investigación titulado "**Desarrollo de técnicas de detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T) utilizando tres pares de primer a través de (PCR) tiempo final.**" como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este informe final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



…….

Xiomara Monserrath Chasi Oyasa

DEDICATORIA

La presente investigación está dedicada en primer lugar a Dios quien me ha dado la fuerza día día para no rendirme, quien me ha sabido brindar sabiduría e inteligencia para sobrepasar cada obstáculo, gracias a su bendición he podido alcanzar este gran objetivo gozando de lo más maravilloso que tengo: mi familia.

A mis padres Elina y Edwin que con su ejemplo de, lucha, y trabajo diario han sido mi pilar fundamental en mi vida, gracias por haber depositado su confianza en mí, su esfuerzo y mi dedicación han dado como resultado alcanzar uno de mis sueños, siempre teniendo en cuenta cada uno de sus consejos diarios que han hecho de mí una mejor persona.

A mi hermana, Alison, por ser mi apoyo diario, por sus palabras motivadoras, su ayuda constante que me han servido para enfocarme en mi objetivo y así poder cumplirlo, te agradezco por nunca haberme dejado sola en este camino de varios sacrificios diarios a lo largo de mi carrera.

A la persona más importante que Dios me ha brindado a mi hijo Andrés, cada paso que he dado ha sido pensando en ti eres y serás mi motivación más grande y el amor más puro que puedo tener , hijo tu más que nadie sabes el esfuerzo que nos ha costado llegar a esta meta pues durante todo este tiempo tú has ido de la mano junto conmigo en cada momento.

A mi tía Mercedes Chase por ser una mujer perseverante que claramente con su ejemplo me ha ayudado como espejo para no rendirme ha sido una gran ayuda a lo largo de mi carrera con cada uno de sus consejos por ser la persona q me ha incentivado a no rendirme.

AGRADECIMIENTO

A mi madre por ser una mujer luchadora y que no se ha dejado vencer pese a las circunstancias, por haber confiado en mí, y habe2rme brindado la oportunidad de ser una mujer profesional, a mi padre por su lucha diaria de guiarme por el camino del bien, por permitirme caer y poder enfrentar los momentos difíciles. 2A mi hermana por ayudarme a llevar una responsabilidad juntas, por siempre cuidarme y estar siempre que la necesite. Gracias a toda mi familia por apoyarme condicionalmente y sobre todo por estar siempre conmigo en cada momento bueno y malo.

A mi hijo, por ser la motivación y mi fortaleza en cada momento, agradezco cada mañana ver tu sonrisa, y que me digas Mamá, Lamento en ocasiones no haber estado presente en tus momentos importantes, sabes que mi ausencia ha tenido un propósito, mi pequeño Andy hemos llorado y reído juntos por varias ocasiones, esos momentos que me motivan a seguir adelante nunca dudes del amor que te tengo.

A la Universidad Técnica de Ambato de manera especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por abrirme sus puertas y haberme formado profesionalmente. A mis docentes por haber compartido sus enseñanzas y haber cumplido su misión de haber formado una profesional.

Al Doctor Michel Leiva Mora, por haberme permitido ser parte de este proyecto, bajo su autoridad por haber depositado su confianza en mí, por su inigualable capacidad de enseñanza ser una excelente guía para poder hacer de mí una buena profesional. Le agradezco profundamente su comprensión, paciencia y disposición para ayudarme a superar los retos que surgieron durante la elaboración de este proyecto, lo cual se nos ha permitido obtener resultados positivos a nivel científico y personal.

A la Doctora Diana Gonzales por haber compartido sus conocimientos y sobre todo ser mi guía fundamental, a lo largo de todo este proceso. Sus conocimientos y experiencia fuerón

importantes para poder llevar a cabo esta investigación de manera exitosa. Muchas gracias por creer en mí y empujarme a dar lo mejor de mí en cada etapa del proyecto.

A mis amigos en especial a Tannia Galarza y Christian Chacha que me han acompañado durante todo este tiempo, donde me han brindado su amistad incondicional su apoyo y por haber vivido buenos y malos momentos y ser mis mayores consejeros.

INDICE GENERAL

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN i

DERECHO DE AUTOR iii

DEDICATORIA iv

AGRADECIMIENTO v

CAPÍTULO I 1

1.1 Introducción 1

MARCO TEÓRICO 5

1.2 Antecedentes investigativos 5

1.3 Fundamentación teórica 7

1.3.1 Origen de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense 7

1.3.2 Taxonomía 7

1.3.3 Enfermedad Mal de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T 10

1.3.4 Importancia económica de la plaga 10

1.3.5 Aspectos epifitiológicos 12

1.3.6 Distribución de razas a nivel mundial y en Ecuador 13

1.3.7 Ciclo infectivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 13

1.3.8 Diseminación 14

1.3.9 Hospederos 15

1.3.10 Posibles impactos para Ecuador 16

1.3.11 Síntomas 17

1.3.12 Técnicas de detención y de diagnóstico 21

1.3.13 Tipos de PCR 22

1.4 Objetivos....23
Objetivo general....23
Objetivos específicos....23
CAPITULO II....25
METODOLOGÍA....25
2.1. Ubicación del experimento....25
2.2 Características de la zona de estudio....25
2.3 Equipos y materiales....26
2.3.1 Equipos....26
2.3.2 Materiales....26
2.3.3 Reactivos....27
2.4 Factores de estudio....28
2.5 Diseño Experimental....30
2.6 Manejo del experimento....30
2.6.1 Obtención de la biomasa de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T)....30
2.6.2 Protocolo de centrifugación y liofilización de la biomasa de *E. coli*....34
2.6.3 Protocolo de extracción del ADN....35
2.6.4 Protocolo de amplificación....36
2.6.5 Protocolo de electroforesis en geles de agarosa....39
2.6.6 Visualización de las bandas de ADN....40
CAPITULO III....42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN....42
3. Evaluación de la influencia de la concentración de agarosa sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR....42

3.2. Evaluación de la influencia de la temperatura de apareamiento de los cebadores sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T mediante PCR. 45

3.3. Determinación de la influencia del tipo de marcador de peso molecular sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR. 48

3.4. Selección del tipo de agente intercalantes que permita una mejor visualización de bandas a amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR..... 50

CAPITULO IV 54

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 54

Recomendaciones 54

Referencias Bibliografícas..... 57

Índice de tablas

Tabla 1.Clasificación taxonómica de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Raza 4 Tropical 9

Tabla 2. Principales hospederos de cada una de las razas conocidas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.....15

Tabla 3. Factor 1 Concentración de agarosa.....28

Tabla 4. Factor 2 Influencia de la temperatura de hibridación (annealing).....28

Tabla 5. Factor 3 Influencia del tipo de marcador molecular.....29

Tabla 6. Influencia de dos agentes intercalantes de uso común en la visualización de bandas de ADN.....29

Tabla 7.Tiempos en el termociclador 37

Tabla 8.Condiciones en el termociclador para la amplificación mediante PCR utilizando los juegos de primers W2987-R Y W2987F. 38

Tabla 9. Talla de los productos amplificados esperados por los juegos de primer (W2987 F, W2987 F; FocTR4-F; FocTR4-R; EF1; EF2…….....40

Índice de figuras

Figura 1. Principales provincias productoras de banano de exportación en Ecuador. 11

Figura 2. Estructuras morfológicas producidas por *Fusarium oxysporum.*.....12

Figura 3 . Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc) del banano.....14

Figura 4. Medios de propagación de la enfermedad (ICA, 2020) 14

Figura 5. Posibles impactos que causaría la introducción de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T para Ecuador (Agrocalidad, Ecuador sin *Fusarium* R4T, 2021).....16

Figura 6. Síntomas externos causados por *F. oxysporum* f.sp. cubense R4T.....18

Figura 7.Síntomas internos causados por *F. oxysporum* f.sp. cubense R4T 19

Figura 8. Ubicación del Ensayo Handy GPS – mapa: zoom 16.....25

Figura 9. Principales etapas de una reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR). .37

Figura 10. Gel de agarosa al 1% sin visualización de bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C). 42

Figura 11.Gel de agarosa al 1.5% visualización de bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR. El juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C). 43

Figura 12.Gel de agarosa al 2.0 % visualización de bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR. El juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C). 44

Figura 13.Temperatura de hibridación (annealing) de 59°C no se observaron bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR. El juego de primer

W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).....45

Figura 14. Temperatura de hibridación (annealing) de 60°C se observaron bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR primer. El juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).....46

Figura 15.Temperatura de hibridación (annealing) de 61°C no se observaron bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR primer. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).....47

Figura 16.Marcador de 50 pb se observó la banda de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C) 48

Figura 17.Marcador de peso molecular 100 pb se observó la banda de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C). 49

Figura 18.Agente intercalantes Bromuro de etidio no se pudo observar una visualización de bandas a amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C). 50

Figura 19. Agente intercalantes Syber safe se pudo observar una visualización de bandas a amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).....51

Índice de ilustraciones

Ilustración 1 . Esquema de preparación del medio de cultivo para la obtención de liofilización de *F. oxysporum* f. sp. cubense raza 4 R4T. 31

Ilustración 2. Esquema de preparación del medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) para la obtención de biomasa bacteriana de la cepa *E. coli* (ESPE) 32

Ilustración 3. Esquema de preparación para la centrifugación y liofilización. 34

Ilustración 4.Esquema para la extracción de ADN de *Fusarium oxysporum f.* sp. cubense R4T. 35

Ilustración 5. Esquena de protocolo de amplificación. 36

Ilustración 6. Esquema de protocolo para la electroforesis. 40

RESUMEN

Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 (R4T) es un patógeno que afecta específicamente a las musáceas. Este agente fitopatógeno causa las enfermedades más devastadoras de estos cultivos a nivel mundial. Atacando varios cultivares pertenecientes al subgrupo Cavendish (AAA), son seriamente afectadas por la raza 4 quienes representa a la mayoría de la producción y exportación mundial en la actualidad. Para la presente investigación se tuvo como objetivo "Desarrollar técnicas de detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T) utilizando tres pares de primer a través de (PCR) tiempo final". Para dar cumplimiento al mismo, se liofiliza la biomasa, se extrajo el ADN con el uso de los tampones (Tampón A NaOH + Tween 20 y Tampón B Tris HCl + EDTA). Posteriormente se centrífugo y se limpió con etanol. Se conservó a -20°C. Para la amplificación mediante el PCR convencional se establecieron diferentes programas acordes con los juegos de primer usados. Se utilizó 4 µl de la solución Mastermix por cada reacción, juegos de primers (Foward- reverse), agua ultra pura, para completar un volumen de reacción final de 54 µl. Para la visualización de los geles se utilizó agarosa al 1.5% con los siguientes juegos primer (W2987-F; W2987-R y FocTR4-F; FocTR4-R) y al 1% de agarosa con el juego de primer EF1 - EF2 y el buffer de corrida TAE 1X, utilizando 2 µl el agente intercalante SYBR safe para poder observar las bandas de ADN de Invitrogen. Por último, se utilizó los marcadores moleculares (Tracklt ™ 50bp y 100 pb Invitrogen), para determinar el tamaño de las bandas. Teniendo como resultados la presencia de banda de ADN con el primer W2987-F ; W2987-R y FocTR4-F ; FocTR4-R se utilizó el marcador de peso molecular de (Tracklt ™ 50bp Invitrogen) al 1.5% de agarosa, a una temperatura de hibridación (annealing) 60 °C, se visualizó bandas de 452 y 463 aproximadamente, con el primer EF1 y EF2 R se utilizó el marcador molecular de (Tracklt ™ 100 bp Invitrogen) al 1% de agarosa, a una temperatura de hibridación (annealing) 60 °C se visualizó una banda de 700bp aproximadamente.

Palabras clave: annealing, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4, musáceas, primers, PCR.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4 (R4T) is a pathogen that specifically affects Musaceae. This phytopathogenic agent causes the most devastating diseases of these crops worldwide. Attacking several cultivars belonging to the Cavendish subgroup (AAA), they are seriously affected by race 4, which currently represents the majority of world production and export. The objective of this research was to "Develop detection techniques for Fusarium oxysporum f. sp. cubense race 4 (R4T) using three pairs of primer through end-time (PCR). To comply with this, the biomass is lyophilized, the DNA was extracted with the use of buffers (Buffer A NaOH + Tween 20 and Buffer B Tris HCl + EDTA). It was subsequently centrifuged and cleaned with absolute ethanol, and stored at -20°C. For amplification using conventional PCR, different programs were established according to the primer sets used. 4 µl of the Mastermix solution was used for each reaction, sets of primers (Forward-reverse), ultrapure water, to complete a final reaction volume of 54 µl. For visualization of the gels, 1.5% agarose was used with the following sets of primer W2987-F; W2987-R and FocTR4-F; FocTR4-R and 1% agarose with the primer EF1 and EF2 and the 1X TAE running buffer, using 2 µl of the SYBR safe intercalating agent to be able to observe the Invitrogen DNA bands. Finally, molecular markers (Tracklt TM 50bp and 100 bp Invitrogen) were used to determine the size of the bands. The results were the presence of a DNA band with the first W2987-F; W2987-R and FocTR4-F; FocTR4-R, the molecular weight marker (Tracklt TM 50bp Invitrogen) was used at 1.5% agarose, at a hybridization temperature (annealing) of 60 °C, bands of approximately 452 and 463 were visualized, with the primer EF1 and EF2. R the molecular marker (Tracklt TM 100bp Invitrogen) was used in 1% agarose, at a hybridization temperature (annealing) of 60 °C a band of approximately 700bp was visualized.

Keywords: annealing, *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4, musáceas, primers, P

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

La actividad productiva del banano tiene los más altos índices de exportación en el mundo, consta con una superficie mundial de 6 719 720 ha con una producción aproximada de 1 600 a 2 200 por hectárea al año .Este producto es uno de los más consumidos a nivel mundial, ya que representa una gran importancia nutricional, la exportación de banano representa uno de los mayores ingresos económicos es por eso que ocupa el segundo puesto en las exportaciones, después del petróleo su gran importancia se basa en el crecimiento económico y desarrollo a nivel mundial, sus principales países exportadores son Filipinas, Costa Rica y Ecuador. (FAO, 2022)

Ecuador es uno de los principales países exportadores y productores de banano cuenta con una superficie de 167.893 ha plantadas, y está distribuida entre los Ríos, Guayas, El Oro que son las provincias más importantes destinadas a este cultivo, su exportación llega a 79 países y genera 2% del PIB general y el 35% del PIB (producto interior bruto) agrícola. En enero del 2023 se exportaron 382.1 millones, alcanzando una cantidad aproximada de 3.272 millones de dólares que equivale a 7 toneladas exportadas a los principales países en este caso Rusia y Estados Unidos. El banano es uno de los productos mejores ofertados por el Ecuador ya que genera una gran aportación económica. (Agrocalidad, 2023)

Ecuador posee una gran diversidad de musáceas, con más de 500 accesiones en su acervo genético. Entre ellas se destaca el cultivar "Gros Michel", que lamentablemente fue severamente afectado en 1950 por el primer brote de la Raza 1 del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, una enfermedad que resultó incontrolable. En respuesta, los exportadores y cultivadores ecuatorianos decidieron adoptar cultivares del subgrupo Cavendish, originarios de Vietnam, los cuales demostraron resistencia a raza 1 de y se adaptaban fácilmente a diversos ambientes,

incluyendo zonas semiáridas y subtropicales. Estos cultivares Cavendish no solo poseían características agronómicas como grosor y vigor, sino también un buen desempeño productivo, racimos cilíndricos y compactos con un excelente rendimiento y calidad que aún siguen teniendo interés en la actualidad. De hecho, los bananos Cavendish son actualmente los más representativos de las exportaciones ecuatorianas, ocupando aproximadamente el 99% del mercado de exportación (Agrocalidad, 2013)

Los principales cultivares de Ecuador pertenecen al subgrupo Cavendish que agrupa clones muy extendidos en la producción como son: William, Grande naine y Valery. El cultivar William (*Musa acuminata* subgrupo Cavendish, AAA), tiene un pseudotallo vigoroso y tiene una raíz amplia la cual genera resistencia al viento, de rápido crecimiento, y se adapta fácilmente a climas extremos a su vez Grande naine (*Musa acuminata*, AAA) denominada así por tener grandes racimos en una planta mediana caracterizada por tener un pseudotallo grueso, hojas ligeramente largas y pecíolo cortos (García, 2003). El cultivar Valery (*Musa acuminata*, AAA), posee un tallo relativamente alto, racimos de buena calidad y resistente a las enfermedades (INIAP, 2013). Por otra parte, Baby banana (*Musa acuminata* AA) denominada así por su pequeño tamaño, de piel amarilla de pulpa casi blanca con alta consistencia (MAGAP, 2017)

Las principales problemáticas agro productivas están relacionadas con factores bióticos, dentro de ellas sus principales limitantes son: Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), moko del banano y plátano, bacteriano (*Ralstonia solanacearum*), nematodos y algunas enfermedades virales. *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (Foc), establecida por Link en el año 1809, W.C. Snyder & H.N. Hansen, lo reclasificaron en 1940 dando lugar a la clasificación de forma especial (f. sp) (Schoch, 2020).

Este patógeno se ha dividido en razas puesto que algunas de ellas se especializan en parasitar determinados genotipos de *Musa* sp. Se conocen actualmente 4 razas diferentes de Foc.

La raza 1 causó una epidemia en América Latina y el Caribe y afectando a los cultivares “Gros Michel” y Silk, la raza 2 afectó fundamentalmente al cultivar de plátano Bluggoe (ABB), la raza 3 se informó en *Heliconia* spp mientras que la Raza 4 se dividió en subtropical (SR4) y tropical (R4T) (Agrocalidad, 2021).

La raza 4 tropical (R4T) tiene cepas con capacidad de infectar al subgrupo Cavendish de estas cepas se han clasificado de acuerdo con los grupos de compatibilidad vegetativa (VCG), a los cuales pertenecen, donde la RT4 pertenece al VCG01213716 y representa la principal amenaza de los cultivos de banano y plátanos a nivel mundial. La raza STR4 está distribuida en zonas subtropicales donde las plantas de bananos están expuestas a temperaturas frías (Sudáfrica e Islas Canarias), mientras que la raza R4T prevalece principalmente en condiciones tropicales, aunque también se adapta a condiciones subtropicales. (PLOETZ, 2009)

Para la detección y diagnóstico de Foc R4 se han utilizado varias alternativas las primeras fueron en base a la sintomatología que manifestaban los cultivares susceptibles aunque es un método sencillo y no costoso tiene como limitante de que se requiere especialista con un alto nivel de preparación, muchas de las sintomatologías pueden ser confundidas, se puede manifestar el síndrome de plata verde (asintomático) es por ello que hace falta contar con herramientas más precoces, rápidas y eficaces que ofrece con un diagnóstico más confiable. Actualmente contamos con herramientas investigativas como: secuenciación de genomas, paralela y enzimática, postulado de Koch, análisis filogénico, y entre las más recientes es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Velarde, 2018)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha caracterizado por ser una de las técnicas más confiables y eficientes en la detección de agentes patógenos en un corto período de tiempo. Esta técnica se basa en el análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual está compuesto por dos cadenas de nucleótidos. Las bases nitrogenadas que los conforman son únicamente la adenina, timina, citosina y guanina, y estas se aparean de manera específica

(adenina con timina, y citosina con guanina) durante el proceso de amplificación del material genético. Existen factores que afectan la especificidad de la PCR, como las secuencias de los iniciadores o cebadores, los cuales deben estar diseñados según la región o el segmento que se necesita amplificar. Una adecuada selección de los cebadores es fundamental para asegurar la correcta amplificación de la secuencia de interés (Tamay de Dios, 2013)

El objetivo de esta revisión es proporcionar una guía detallada para desarrollar un estudio de investigación basado en técnicas moleculares, específicamente la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional en tiempo final. Este método se basa en el uso de un ácido desoxirribonucleico (ADN) específico, cebadores oligonucleótidos que sirven como punto de inicio para la síntesis del ADN, y la enzima ADN polimerasa termoestable. La reacción de PCR comprende tres etapas sucesivas: Desnaturalización: donde se separan las dos cadenas del ADN a continuación hibridación: en la que los cebadores se unen a las secuencias complementarias del ADN a una baja temperatura, por último, extensión: donde la enzima ADN polimerasa cataliza la síntesis simultánea de las dos nuevas cadenas de ADN. Esta técnica se presenta como una alternativa promisoria para detectar de manera precoz focos infecciosos de *Fusarium oxysporum* (Leyvamir, 2003)

Cabe recalcar que una de las mayores desventajas de estas técnicas es elevado costo, es por ello que se han realizado asociados o consorcios de trabajo que unen a varios laboratorios con la finalidad de homologar protocolos para detectar esta enfermedad. Actualmente Agrocalidad junto a la ESPOL-CIBE, ESPE, UTA y el INIAP cuentan con personal capacitado para realizar un diagnóstico preciso.

Agrocalidad ha tomado acciones preventivas como la desinfección de maquinaria agrícola, control en los puntos de entrada al país tanto terrestre marítimo y aéreo donde se realiza la desinfección de calzado equipajes, y medidas de Fito sanidad en lugares de producción con esto se ha logrado que esta enfermedad no se encuentre en el país. (Agrocalidad, 2021)

En base a las problemáticas anteriores el presente trabajo se propone como hipótesis: mediante el análisis de la influencia del porcentaje de agarosa, temperatura de hibridación de oligonucleótidos, tipos de marcadores moleculares y tipos de agentes intercalantes, así como del uso de juegos de primeros estándares (W2987 F/R, Foc TR4 F/R y EF1 y EF2) se podría visualizar bandas de ADN amplificadas a partir del ADN genómico de *F. oxysporum* f.sp. cubense R4T en geles de agarosa.

MARCO TEÓRICO

1.2 Antecedentes investigativos

Li et al., (2013) en su estudio, "Identificación y aplicación de locus genéticos único en el diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza tropical R4T" caracterizaron el mutante W2987, el cual mostró un crecimiento más lento, produjo menos conidios y fue menos virulento que la cepa original. El análisis mediante PCR entrelazada asimétrica (TAIL-PCR) mostró que el ADN-T se colocó en la tercera región no traducida (UTR) de un marco abierto de lectura (ORF) en W2987. Los aislados TR4 cubense fueron distintos de otros aislados de *F. oxysporum*. Este resultado indicó que este locus genético posiblemente asociado con la virulencia era una región del ADN confiable para el diagnóstico y detección de *F. oxysporum* f. sp. cubense TR4.

(Dita et al., 2010) mencionaron en su estudio" diagnóstico molecular para la raza tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense que la región genómica del factor de alargamiento transcripcional (TEF-1a) y la región espaciadora intergénica (IGS) del operón ribosómico nuclear de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, desarrollaron una herramienta de diagnóstico molecular basada en PCR para detectar específicamente aislados que pertenecían al grupo de compatibilidad vegetativa VCG 01213, también conocido como raza tropical 4 (TR4). Se determinó que este procedimiento de diagnóstico es actualmente la mejor opción para la detección y monitoreo rápido y confiable de TR4.

(Geiser et al., 2004) mencionaron que la base de datos "*FUSARIUM-ID v. 1.0*" se encuentran depositadas secuencias de ADN específicas de varias especies de *Fusarium* como las correspondientes a la región del factor de alargamiento de traducción parcial 1-alfa (TEF-1a). Además, en esta base de datos se encuentran depositadas secuencias correspondientes con genes vinculados con toxinas tricoteceno tipo B y otras producidas por especies como: *Gibberella fujikuroi* (GAs), *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*.

Esta base de datos permite a los investigadores generar nuevas secuencias de cebadores utilizando herramientas bioinformáticas y también permiten analizar los porcentajes de homologías entre secuencias utilizando el programa BLAST. La identificación correcta de una especie conocida en estos grupos a menudo se puede realizar utilizando esta región genética únicamente. Esta base de datos en crecimiento contendrá solo secuencias respaldadas y depuradas por la comunidad científica especializada en especies del género *Fusarium,* las cuales están disponibles públicamente como en el caso En el futuro, FUSARIUM-ID la cual se ampliará para incluir secuencias adicionales, incluidas secuencias múltiples de la misma especie.

Mientras, (Li et al., 2008) en su investigación titulada "Desarrollo de un marcador molecular para la detección específica de *Fusarium oxysporum* f. sp. carrera cubense 4" realizaron un diagnóstico eficaz, rápido y sobre todo confiables para la detección de Foc raza 4, a través de amplificación por PCR. En la metodología se utilizó la identificación, el aislamiento del ADN y la técnica de electroforesis. Este autor utilizó como marcador de peso molecular 100 pb de GeneMark Techology. Los resultados obtenidos permitieron la visualización de banda de ADN de 404 pb específica de la raza 4 de Foc.

Así también (Oloriz et al., 2021) en el artículo titulado "Protocolo para la detección rápida de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 1 en banano." Dentro de su metodología en la parte de electroforesis tiñeron los geles de agarosa con bromuro de etidio 0.5 µl para visualizar las bandas, como resultado se observó una banda de 210 pb que correspondió con la talla

esperada del fragmento amplificado. Estos autores concluyeron que este agente intercalante dio resultados positivos para la visualización de las bandas amplificadas.

Por otra parte, (Magdama et al., 2020), en su artículo titulado “Diversidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, el patógeno del marchitamiento por *Fusarium* del banano, que el objetivo fue evaluar la diversidad genética de Foc. Para visualizar las bandas de ADN amplificadas se utilizó un gel de agarosa al 1%.

1.3 Fundamentación teórica

1.3.1 Origen de Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Se cree que la enfermedad se originó en el sureste asiático, aunque los primeros indicios de la enfermedad fueron en Australia en 1874. Posteriormente de ahí se reportó en Panamá en 1890, esta enfermedad se divide en dos variantes (RT4 y STR4). Sin embargo, para Sudamérica RT4 es la de mayor interés. La RT4 mostró sus primeros indicios en Taiwán en 1967 en cultivares del subgrupo Cavendish. En 1990 la susceptibilidad de este subgrupo a la RT4 se hizo oficial al observar grandes extensiones de plantaciones afectadas. En 2019, ya se conoció la presencia de la enfermedad en la península de la Guajira, en Colombia siendo el primer caso detectado en el continente americano. (Rodriguez, 2018)

1.3.2 Taxonomía

1.3.2.1 Reino Fungi

Se estima que el reino Fungi pueden contener alrededor de 1.5 millones de especies. Sus representantes cumplen un papel importante en el nuestro planeta ya que son excelentes descomponedores de la materia orgánica. Los principales filum dentro del reino Fungi son: Chitridiomycetes, Zygomycetes, Glomeromycota, Ascomycetes y Basidiomycetes. Los hongos tienen características únicas que los diferencian del resto de los microorganismos como: son eucariotas quiere decir que cuentan con un núcleo bien definido, son heterótrofos y se producen

por esporas tanto asexual (conidios) como sexual (cruce de dos hifas haploides que dan como resultado meiosporas), su pared celular está formada por quitina, respiración aerobia, son principalmente terrestres habitando en lugares húmedos (Calcáneo & Cueva, 2021)

Fusarium oxysporum R4T ataca fundamentalmente a las Musáceas y se dice que este hongo fitopatógeno podría provocar la desaparición de numerosos cultivares de banano y plátano en Ecuador y a nivel mundial.

1.3.2.2 Filum Ascomycota

Sus representantes poseen una reproducción sexual la cual da lugar a la formación de ascosporas que suelen estar contenidas dentro de ascas y éstas a su vez se encuentran en el interior de cuerpos fructíferos como: apotecios, cleistotecios y pseudotecios (Kuhar et al., 2013)

1.3.2.3 Género *Fusarium* Foc

F. oxysporum f.sp. cubense crece favorablemente en el rango de 24°C y los 28°C. Es un hongo ascomicete filamentoso y cosmopolita con un micelio bien desarrollado, septado, conidióforos característicos que en ocasiones pueden formar monofiálides y en otras esporodoquios, posee especies que pueden colonizar tanto parte subterránea como área de las plantas. Muchas especies son necrotróficas causando afecciones irreversibles que en muchos casos conducen a la muerte de la planta**.** (Martínez et al., 2014)

1.3.2.4 Reproducción

Su reproducción puede ser de forma sexual (teleomorfo estadio reproductivo) o asexual (anamorfo o fase vegetativa). La fase anamorfa es la más común y se caracteriza por producir distintos tipos de conidios (esporas asexuales) macroconidias (forma de media luna), microconidias (conidios que puedes ser monocelulares o bicelulares). También puede producir clamidosporas (se forma directamente del micelio y suelen estar presentes en los restos de cosechas) (Leslie y Summerell, 2006).

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Fusarium oxysporum f. sp. cubense Raza 4 Tropical

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Subdivisión	Pezizomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Género	*Fusarium*
Especie	*Fusarium oxysporum*
Formae specialis	cubense
Raza	Raza 4 tropical

Fuente: *(EPPO, 2018)*

1.3.2.5 Nombre científico

Fusarium oxysporum f. sp. cubense Raza 4T es el nombre científico utilizado para identificar cualquier aislado que sea capaz de causar la marchitez vascular en las plantas de plátano y banano de los cultivares del subgrupo Cavendish. Se le denominada Raza 4T, debido a que se presenta fundamentalmente en la franja tropical de nuestro planeta y posee una alta virulencia y capacidad para infectar variedades de plátano y banano que antes se consideraban resistentes a la enfermedad (Solórzano et al., 2020)

La Raza 4T ha sido responsable de devastadoras epidemias en diferentes partes del mundo, particularmente en el sudeste asiático, lo que ha llevado a la implementación de estrictas

medidas de control y cuarentena para prevenir su propagación. El estudio y la comprensión de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Raza 4T son de vital importancia para proteger la producción de plátano y banano en Ecuador y garantizar la seguridad y soberanía alimentaria (Prieto et al., 2022)

1.3.2.6 Estudio taxonómico

Se basa en su morfología fundamentalmente. Hollenweber y Reinking lo ubicaron en la sección. Elegans caracterizadas por las diferencias morfológicas sujetas a cambios de ambiente de nominada así *Fusarium oxysporum*, dando a conocer variantes dentro de la especie. El taxón forma especial (f. sp) corresponde a cepas que tiene características morfológicas similares pero diferentes propiedades fisiológicas en su habilidad para parasitar un hospedante determinado, este taxón se predomina para categorizar enfermedades de especies particulares (Granada et al., 2001).

1.3.3 Enfermedad Mal de Panamá causada por Fusarium oxysporum f. sp. cubense R4T

Fusarium oxysporum conocido como el mal de Panamá o también denominado marchitamiento vascular, es considerada como una de las enfermedades más devastadoras a nivel mundial. La raza 4 tropical es el nombre que se le dio a la cepa causante del marchitamiento del (plátano, orito, banano), incluyendo al cultivar Cavendish denominado. Este hongo es saprófito porque pude pasar inactivo en restos de cosechas sin la necesidad de ningún hospedero: Su viabilidad en el suelo en ausencia de hospedero puede ser de hasta 30 años. Desde su surgimiento ha experimentado una rápida propagación ocasionando daños ya a más de 20 países productores de banano, la cual preocupa a nivel global. Este patógeno no se puede controlar con ningún fungicida. (López et al., 2019)

1.3.4 Importancia económica de la plaga

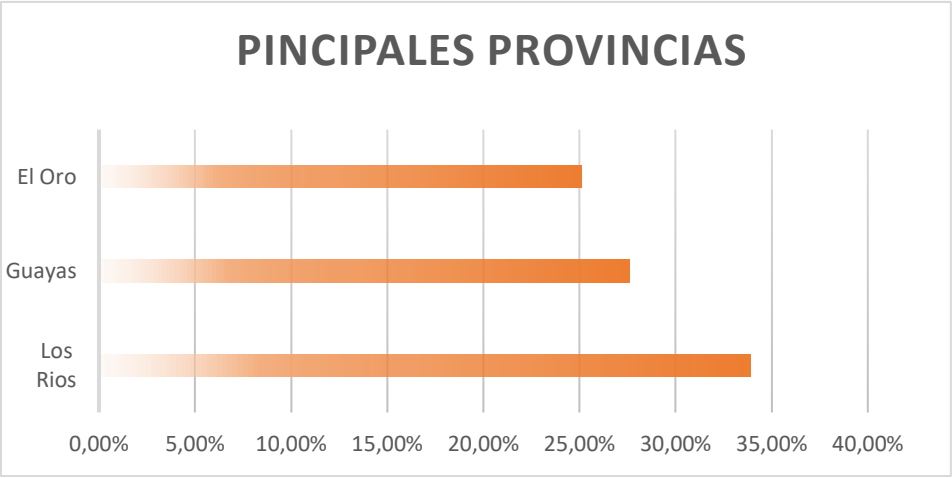
Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 es una amenaza para todas las industrias bananeras del mundo y en particular para las bananeras ecuatorianas cuyos cultivares pertenecen

al subgrupo Cavendish. Algunos especulan que Foc R4T puede llegar a desparecer las plantaciones de banano a nivel mundial ya que muchas de ellas se basan en la plantación de Cavendish.

La producción del banano es fundamental como una de las principales fuentes agrícolas de ingreso. En el Ecuador el banano genera ingresos y empleo en más de 120 000 familias, siendo el principal sector de actividad económica exportadora con un volumen aproximado de 7 millones de toneladas para unos 79 países. Entre enero y agosto del 2023 se exportaron 247.96 millones de cajas un 7.17 % esto supero al año 2022. En Ecuador existe una superficie de 167.893 ha, distribuidas en las zonas costeras (Los Ríos, Guayas y El Oro,) las principales provincias destinadas a la exportación de este importante cultivo. (Gonzabay, 2013)

Figura 1.

Principales provincias productoras de banano de exportación en Ecuador.



Adaptado de Excel (Gonzabay, 2013)

1.3.5 Aspectos epifitiológicos

1.3.5.1 Infección

Fusarium oxysporum f. sp. cubense, se establece sistémicamente dentro del xilema de las Musáceas ocasionando los síntomas de marchitez, epinastia y muerte de la planta. **(Kidane y Laing, 2010)**

1.3.5.2 Patogénesis

Este patógeno infecta las raíces jóvenes de la planta de banano o plátano. Las plantas suelen producir tilosas para contener el avance del hongo y con ello quedan ocluidos los haces vasculares que impiden el transporte de agua y nutrientes a la parte aérea de la planta, que al cabo del tiempo se marchita y muere **(Leong et al., 2009)**

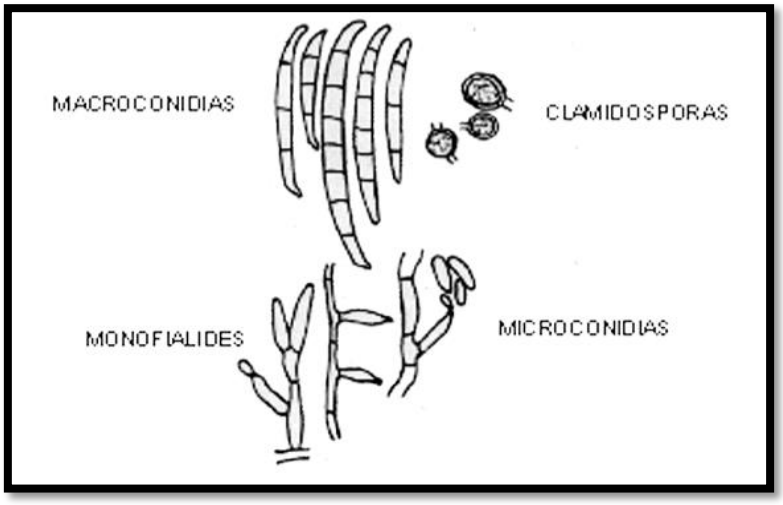
1.3.5.3 Estructuras infectivas

Este hongo produce dos clases de esporas asexuales: microconidias y macroconidias y una estructura muy resistente que son las clamidosporas.

Se puede propagar a través de macroconidias, microconidias y clamidosporas. Los macroconidias y microconidias tienen una resistencia baja a las variaciones de las condiciones ambientales. En cambio, las clamidosporas tienen una pared celular gruesa y muchas reservas intracelulares que le permiten sobrevivir a condiciones de ambiente extremo, incluso pueden permanecer viables en los suelos por 30 años sin la necesidad de un hospedero. Los macroconidias, microconidias y clamidosporas se pueden dispersar tanto a través del suelo como del agua lo cual hace más difícil su manejo (Barajas, 2021)

Figura 2.

Estructuras morfológicas producidas por Fusarium oxysporum.



Fuente*: (Tudela, 2000)*

1.3.6 Distribución de razas a nivel mundial y en Ecuador

El término raza se utiliza para determinados aislados dentro de las formas especiales que solo producen daños en ciertos cultivares. La raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, afecta a los cultivares Gros Michel (AAA), Silk (AAB) y Manzano (ABB). Por otra parte, la raza 2 afecta a cultivares Bluggoe (ABB), Pelipita (ABB), Guineo (ABB), Cuadrado (ABB), Topocho (ABB) y Chatos (ABB). La raza 3 se especializa en infectar a *Heliconias*. Finalmente, la raza 4 aunque suele ser más virulenta en cultivares del subgrupo Cavendish (AAA también afecta a Gros Michel (AAA) y Bluggoe (ABB). La raza 4 suele subdividirse en raza 4 tropical (T4) y raza 4 subtropical (SR4). La raza 4 subtropical (SR4) se ha observado en Islas Canarias, Australia y Sudáfrica mientras que la raza 4 tropical puede afectar tanto en la región tropical como subtropical. (Zapata & Castaño-Zapata, 2019)

1.3.7 Ciclo infectivo de Fusarium oxysporum **f. sp. cubense raza 4**

Sus esporas (macro, microconidias y clamidosporas) están en el suelo o las plantas de diferentes hospedantes y sus restos de cosecha.

Las clamidosporas llegan a germinar cercanas a las raíces de las plantas de *Musa* spp, luego penetran los tejidos vasculares estimuladas por las sustancias secretadas por los tejidos dañados, permitiendo que los tubos germinativos entren por las raíces jóvenes del banano. Una vez dentro de las raíces comienzan a colonizar el sistema vascular mediante el crecimiento micelial. Las plantas comienzan a producir tilosas para evitar el avance del micelio, lo cual bloquea los haces xilemáticos causando los primeros síntomas de amarillamiento o marchitez que se observan en las hojas más viejas. Esto llega a provocar una marchitez permanente y la planta infectada muere, incluso los hijos (seguidoras) fueron contaminadas debido a su conexión vascular con la planta madre enferma aun cuando sean asintomáticas. (Lara, 2021)

Figura 3.

Ciclo de vida de Fusarium oxysporum f. sp. cubense *(Foc) del banano*



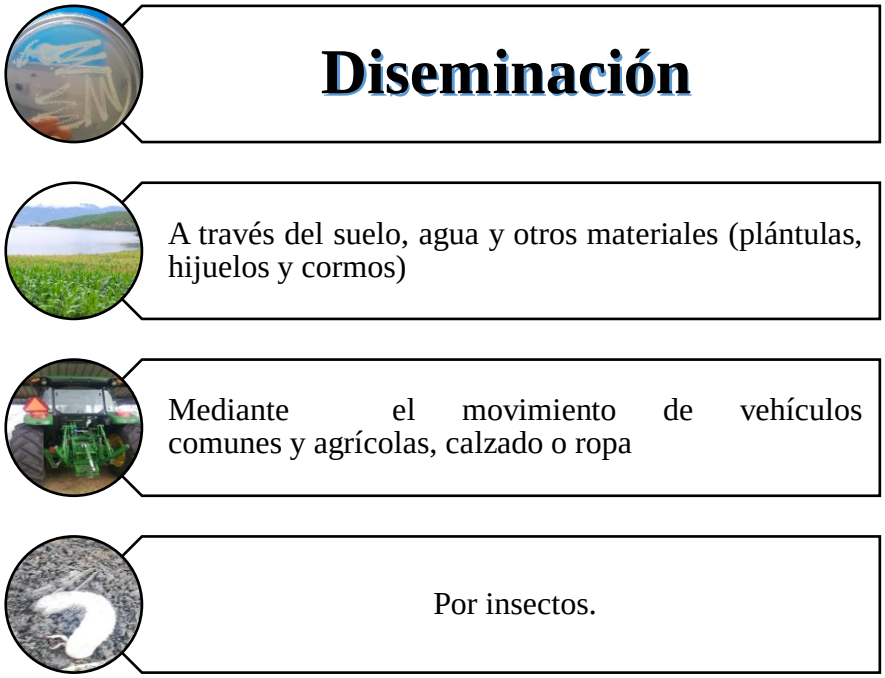
Fuente*:(Dita et al., 2018)*

1.3.8 Diseminación

Foc se propaga a través de diferentes estructuras y distintas vías que aseguran una fácil dispersión:

Figura 4.

Medios de propagación de la enfermedad (ICA, 2020)



1.3.9 Hospederos

Se conocen, cuatro razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, de ellas solo dos tres causan marchitez del cultivo de banano la raza 1 y la raza 4, ya que la raza 2 ataca a plátanos.

Tabla 2.

Principales hospederos de cada una de las razas conocidas de Fusarium oxysporum f. sp. cubense.

Razas de *Fusarium*	Descripción
Raza 1	Surge entre 1920 y 1950. Eliminó grandes extensiones del cultivar “Gros Michel” (AAA) y Silk (banano manzano, *Musa* AAB), los cuales fueron casi eliminados. En esta época Gros Michel era el principal banano para la exportación.

	Se pudo dar solución con la introducción de cultivares del subgrupo "Cavendish" que en la actualidad es el principal exportador a nivel mundial y en Ecuador.
Raza 2	Ataca clones del subgrupo Bluggoe (ABB).
Raza 3	Ataca las heliconias.
Raza 4T	Surgió en 1989 en Malasia. En 2019 llegó a Colombia. No se dispone de variedades resistentes.

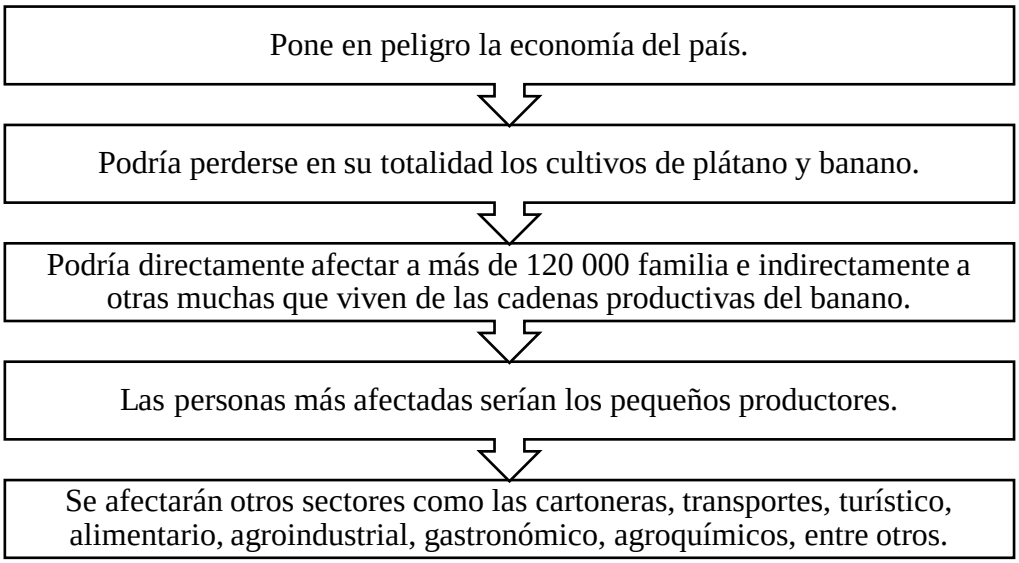
Fuente: (Agrocalidad, 2021)

1.3.10 Posibles impactos para Ecuador

Esta enfermedad al haber sido detectada en Colombia, pone en peligro a Ecuador.

Figura 5.

Posibles impactos que causaría la introducción de Fusarium oxysporum f. sp. cubense R4T *para Ecuador (Agrocalidad, Ecuador sin Fusarium R4T, 2021)*



1.3.11 Síntomas

El mal de Panamá causada por *F. oxysporum* f.sp. cubense bloquea el sistema vascular de la planta, lo cual impide la absorción del agua y nutrientes dando como resultado la marchitez y muerte de la planta.

1.3.11.1 Síntomas externos

F. oxysporum f.sp. cubense R4T tiene la capacidad de afectar a toda clase de cultivo de plátanos y bananos. Este provoca un patógeno que bloquea los tejidos vasculares y causa una muerte repentina primero en hojas viejas y un amarillamiento que comienza en los bordes de las hojas adultas quienes llegan a doblarse por la base de las nervaduras. La muerte suele ser progresiva acompañada de rajaduras del pseudotallo, seguida de deformaciones en hojas nuevas. En ocasiones se puede ver una recuperación momentánea y posteriormente ocurre una recaída que en el término de 3 a 4 meses desde la aparición de los síntomas la planta muere, aunque

permanezca de pie. Para su control no existen productos químicos que controlen al hongo ni tampoco variedades resistentes (Universidad Costa Rica , 2020)

La aparición de un color amarillo uniforme en las hojas antiguas que va desde el margen foliar hacia la nervadura central, estas llegan a marchitarse completamente quedando de color café con agrietamiento del pseudotallo. Al final las hojas marchitas se caen y se mantienen unidas al pseudotallo de las plantas (Falda hawaiana) (AGROCALIDAD, 2019)

Figura 6.

Síntomas externos causados por F. oxysporum f.sp. cubense R4T.

Imágenes	Descripción
	Todas las hojas se vuelven amarillas.
	Las hojas se tornan rojo oscuro hasta provocar su muerte.

	Caen las hojas alrededor de la parte inferior de la planta denominada “Falda hawaiana)
	En la base del pseudotallo se observan rajaduras.

Fuente: (Agrocalidad, 2020)

1.3.11.2 Síntomas internos

Los síntomas internos se observan fundamentalmente en el tejido vascular tanto de las raíces como del pseudotallo. Para ello, se suele realizar un corte transversal y longitudinal del pseudotallo y se puede observar un color pardo-rojizo que es la consecuencia de la decoloración de los haces vasculares xilemáticos (Tabla 4)

Figura 7.

Síntomas internos causados por F. oxysporum f.sp. cubense R4T

Imagen	Descripción

	Sus haces vasculares de color rojizo se observan en un corte transversal.
	Sus haces descolorados se tornan de color café oscuro en un corte longitudinal.

Fuente: *(Universidad Costa Rica, 2020)*

1.3.11.3 Plantas asintomáticas

A diferencia de otras enfermedades, en el caso de la enfermedad causada *por Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4T, las plantas infectadas pueden no manifestar síntomas visibles durante cierto tiempo, y de repente desarrollar una rápida expresión de los mismos. Esto se debe a que las plantas pueden aparentar estar en buen estado, pero luego presentar una manifestación súbita de los síntomas. Debido a esta particularidad, en muchos países productores de banano se prefiere recurrir al uso de técnicas moleculares, las cuales resultan ser más rápidas y sensibles para la detección y el diagnóstico de esta enfermedad. Estas técnicas permiten identificar la presencia del patógeno incluso antes de que los síntomas se expresen visualmente en la planta.

1.3.12 Técnicas de detención y de diagnóstico

De acuerdo con los resultados de Agrocalidad que ha tomado las medidas preventivas contra esta enfermedad, consideran a *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4T como una plaga cuarentenaria, ya que aún no está presente en el país.

1.3.12.1 Teledetección

Se realiza usando espectroscopio de reflectancia (VIS), por análisis de imágenes. Esta técnica se basa en las mediciones de índices de reflectancia que reflejan las superficies foliares de las plantas de banano. Los índices de reflectancia de las hojas de las plantas enfermas difieren de las reflejadas por hojas de plantas sanas. Esta energía reflejada depende de la estructura interna como externa de las plantas. Esta técnica es de gran ayuda para la detección de las plantas sintomáticas, pero no de aquellas asintomáticas. (Portillo, 2020)

1.3.12.2 Técnica de polimorfismo en fragmentos amplificados al azar de ADN (RADP)

La técnica de Polimorfismo en fragmentos amplificados al azar de ADN tiene como ventaja que es una técnica basada en PCR, y necesita poca cantidad de ADN. Es una técnica que solo puede ser aplicada a marcadores moleculares que sean dominantes que se detectan como presencia o ausencia de bandas, mediante esta técnica se puede detectar fuentes de resistencia a *Fusarium oxysporum,* pero no sería sensible y confiable para el diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense raza 4T. (Dávila et al., 2003)

1.3.12.3 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción se trata de un tipo de polimorfismo que es el resultado de la variación en la sucesión de ADN conocido por las enzimas de restricción, que tiene como objetivo realizar cortes en las moléculas de ADN en sitios determinados con el objetivo (NIH, 2023) de determinar la diversidad genética de formas

especiales se usa como marcadores genéticos y se utiliza para detectar la diversidad genética de especies de *Fusarium* asociados a cultivos de naranjilla y babaco (Argotti et al., 2022)

1.3.12.4 Técnicas de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

La técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es una poderosa herramienta molecular que permite la rápida amplificación de ADN a temperaturas constantes, eliminando la necesidad de ciclos de temperatura como en la PCR. Utiliza cuatro o seis cebadores específicos para amplificar secuencias de ADN objetivo, generando una gran cantidad de productos amplificados con alta especificidad y sensibilidad.

La reacción se lleva a cabo en un solo paso y se basa en la actividad de una enzima polimerasa de ADN de alta eficiencia y una serie de reacciones de amplificación en cadena en bucle que resultan en la formación de productos de ADN con estructuras en forma de bastón. La técnica LAMP es rápida, rentable y adecuada para aplicaciones diagnósticas en condiciones de campo.

1.3.13 Tipos de PCR

1.3.13.1 PCR Tiempo Real

La técnica de PCR en tiempo real, también conocida como qPCR (PCR cuantitativa), permite la detección y cuantificación de material genético en tiempo real durante el proceso de amplificación. Se basa en la detección de la fluorescencia emitida por una sonda fluorescente que se unen al ADN en cada ciclo de amplificación, lo que permite el monitoreo en tiempo real del progreso de la reacción. La cantidad de fluorescencia generada está directamente relacionada con la cantidad de ADN amplificado, lo que permite la determinación cuantitativa de la muestra original. Esto proporciona una forma precisa y sensible de medir la cantidad inicial de ADN presente en una muestra, lo que la convierte en una herramienta invaluable en investigaciones

relacionadas con: el diagnóstico clínico, estudios genéticos y otros campos de la biología molecular.

1.3.13.2 PCR Convencional o Tiempo final

La técnica de PCR convencional, también conocida como PCR de tiempo final, es un método de amplificación de ADN que implica ciclos de temperatura para replicar secuencias específicas de ADN. En esta técnica, una muestra de ADN se somete a una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento programados en un termociclador. Cada ciclo consta de tres etapas: desnaturalización, donde el ADN se calienta para separar las hebras complementarias; apareamiento de cebadores (annealing), donde se enfría para permitir que los cebadores se unan específicamente a las secuencias objetivo; y extensión, donde se utiliza una enzima de polimerasa (TAQ Polimerasa) para sintetizar nuevas cadenas de ADN complementarias. Después de múltiples ciclos, la cantidad de ADN amplificado aumenta exponencialmente. Al final de los ciclos, se detiene la reacción y se analiza el producto final, que puede ser visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa o mediante otros métodos de detección. La PCR convencional es una técnica ampliamente utilizada en la biología molecular para diversos fines, principalmente para el diagnóstico de enfermedades e identificación de agentes fitopatógenos. (Tamay de Dios L, 2013)

1.4 Objetivos

Objetivo general

Desarrollar técnicas de detección de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T) utilizando tres pares de primer a través de (PCR) tiempo final.

Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de la concentración de agarosa sobre la visualización de bandas

amplificadas de ADN de *F*. o*xysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR.

- Evaluar la influencia de la temperatura de apareamiento de los cebadores sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *F*. *oxysporum* f. sp cubense R4T mediante PCR.
- Determinar la influencia del tipo de marcador de peso molecular sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *F*. *oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR.
- Seleccionar el tipo de agente intercalantes que permita una mejor visualización de bandas a amplificadas de ADN de *F*. *oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

La investigación se realizó en la provincia de Tungurahua en la Universidad Técnica de Ambato en la Facultad de Ciencias Agropecuarias en el laboratorio de biología molecular en el sector de Querochaca.

Figura 8.

Ubicación del Ensayo Handy GPS – mapa: zoom 16



2.2 Características de la zona de estudio

La Universidad Técnica de Ambato perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, localizada en Cevallos ubicada en Querochaca a una altitud de 2800 msnm, sus coordenadas geográficas son 01°24’27’’ de latitud Sur 78°35´00’’ de longitud Oeste, ubicado al Sureste de Ambato a 19.31 km.

2.3 Equipos y materiales

2.3.1 Equipos

- Balanza analítica (Ohaus® EX124).
- Autoclave (STERMAX).
- Agitador Vortex (CORNING).
- Microondas (Panasonic).
- Bloque térmico (Thermo Scientific).
- Incubadora (red LINE).
- Destilador de agua. (CIENYTEC)
- Cámara de flujo laminar (BIOBASE).
- Liofilizador (Labconco, FreeZone 4.5).
- Termociclador (Biorad®).
- Ultracongelador de -20°C.(Thermo Scientific).
- Centrífuga de tubos Eppendorf (CORNING).
- Plancha térmica con agitación orbital (StableTemp).
- Cámara de electroforesis de geles de agarosa (Biorad®).
- Refrigerador (Indurama).
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

2.3.2 Materiales

- Muestra de ADN de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense R4T.
- Papel aluminio.
- Medio de cultivo sólido Agar Nutriente (AN) (TM MEDIA).
- Medio de cultivo líquido Infusión Cerebro Corazón (BHI) (TM MEDIA).
- Asa de inoculación.

- Alcohol al 70% (v/v)
- Mechero de alcohol.
- Micropipetas de 1000 µL y de 20 µL2.
- Puntas estériles para micropipetas de 1000 µL y de 20 µL.
- Matraz aforado de 1000 mL.
- Cinta selladora (Parafilm®).
- Primers (W2987 F, W2987 F; FocTR4-F; FocTR4-R; EF1; EF2) (Invitrogen).
- Tubos eppendorf (Brand 1.5ml)
- Cajas de Petri de 90 mL.
- Tubos de PCR.

2.3.3 Reactivos

- Agua destilada.
- Agua ultrapura libre de ADN asas (Invitrogen).
- Buffer TAE 500 ml (450 ml agua destilada y 50 ml TAE) para correr los geles.
- EDTA (Sigma -Aldrich, catálogo E1510-10ML).
- NaOH (Sigma -Aldrich, catálogo MFCD00003548).
- Agarosa (Invitrogen).
- Taq ADN Polimerasa (Invitrogen).
- Tris-HCL (Invitrogen).
- Tween 20 (Invitrogen, catalogo, LLl53030).
- Marcador de peso molecular (Track kit 100 pb DNA Ladder marker).
- Tampón de extracción (tapón A NaOH 0.4g y Tween 20 2 ml y tapón B EDTA 0.058 g y Tris HCL 1.576 g).

2.4 Factores de estudio

En base al primer objetivo específico establecido**,** se evaluó la influencia de la concentración de agarosa sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR, se tomaron en cuenta los parámetros ya establecidos por (Li et al., 2013)

Factor N°1. Influencia de la concentración de agarosa expresada en porcentaje sobre la visualización de bandas correspondientes a los fragmentos amplificados de ADN.

Tabla 3.

Factor 1 Concentración de agarosa.

	Porcentaje (%) de agarosa
	T1- Agarosa al 1.0%
	T2- Agarosa al 1.5%
	T3- Agarosa al 2.0%

En base al segundo objetivo se evaluó la influencia de la temperatura de apareamiento de los cebadores sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de F. *oxysporum* f. sp cubense R4T mediante PCR, se tomó en cuenta los parámetros ya establecidos por (Dita et al., 2010) y se propone analizar los siguientes factores:

Factor N°2. Influencia de la temperatura de apareamiento de los cebadores (annealing) sobre la visualización de bandas correspondientes a los fragmentos amplificados.

Tabla 4.

Factor 2 Influencia de la temperatura de hibridación (annealing).

Temperatura	**Grados centígrados**
T1	59°
T2	60°

T3	61°

En base al tercer objetivo se determinó la influencia del tipo de marcador de peso molecular sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR, se tomaron en cuenta los parámetros ya establecidos por (Dita et al., 2010) y se analizaron los siguientes factores:

Factor N°3. Influencia del tipo de marcador de peso molecular sobre la visualización de bandas correspondientes a los fragmentos amplificados.

Tabla 5.

*Factor 3 Influencia del tipo de marcador molecular***.**

Pares de bases	Nombres comerciales
T1- Marcador de 50pb	Thermo Scientific GeneRuler 50bp
T2- Marcador de 100pb	Thermo Scientific GeneRuler 100bp

En base al cuarto objetivo, se seleccionó el tipo de agente intercalante que permite una mejor visualización de bandas amplificadas de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR se tomó en cuenta los parámetros ya establecidos por (Geiser et al., 2004) y se propone analizar los siguientes factores:

Factor N°4. Influencia de tipos de agentes intercalantes sobre la visualización de bandas correspondientes a los fragmentos amplificados.

Tabla 6.

Influencia de dos agentes intercalantes de uso común en la visualización de bandas de ADN.

Agentes intercalantes

T1- Bromuro de etidio.
T2- SYBR SAFE o SYBR Green.

2.5 Diseño Experimental

En el presente estudio se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) donde se verificó la presencia o ausencia de bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 mediante porcentaje de agarosa, temperatura anneling, marcadores moleculares y agentes intercalantes con tres juegos de primers.

2.6 Manejo del experimento

2.6.1 Obtención de la biomasa de Fusarium oxysporum f. sp. cubense raza 4 R4T

A partir de una cepa de *E. Coli* (top 10) del cepario del laboratorio de biología molecular de la ESPE que tiene clonado la región del ADN de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense raza 4T, específico para los tres juegos de primer, se tomaron son 100 µl y se inoculo en el medio líquido LB (Luria -Bertani) en tubos Eppendorf de 1.5 ml.

Para subcultivar la cepa bacteriana se vuelve a sembrar el inóculo bacteriano en medio de cultivo Caldo Cerebro Corazón (Brain Heart InfusiónBroath, BHI). Se pesó 3.7 gramos en la balanza analítica del medio y se colocó en un matraz de 250 ml donde se agregó 100 ml de agua destilada. Se colocó en un agitador orbital a una temperatura de 130°C a 500 revoluciones por minuto. Posteriormente, se puso una capa de papel de aluminio, se sometió a esterilización en autoclave a 120°C y 1,5 Atm de presión durante 20 minutos.

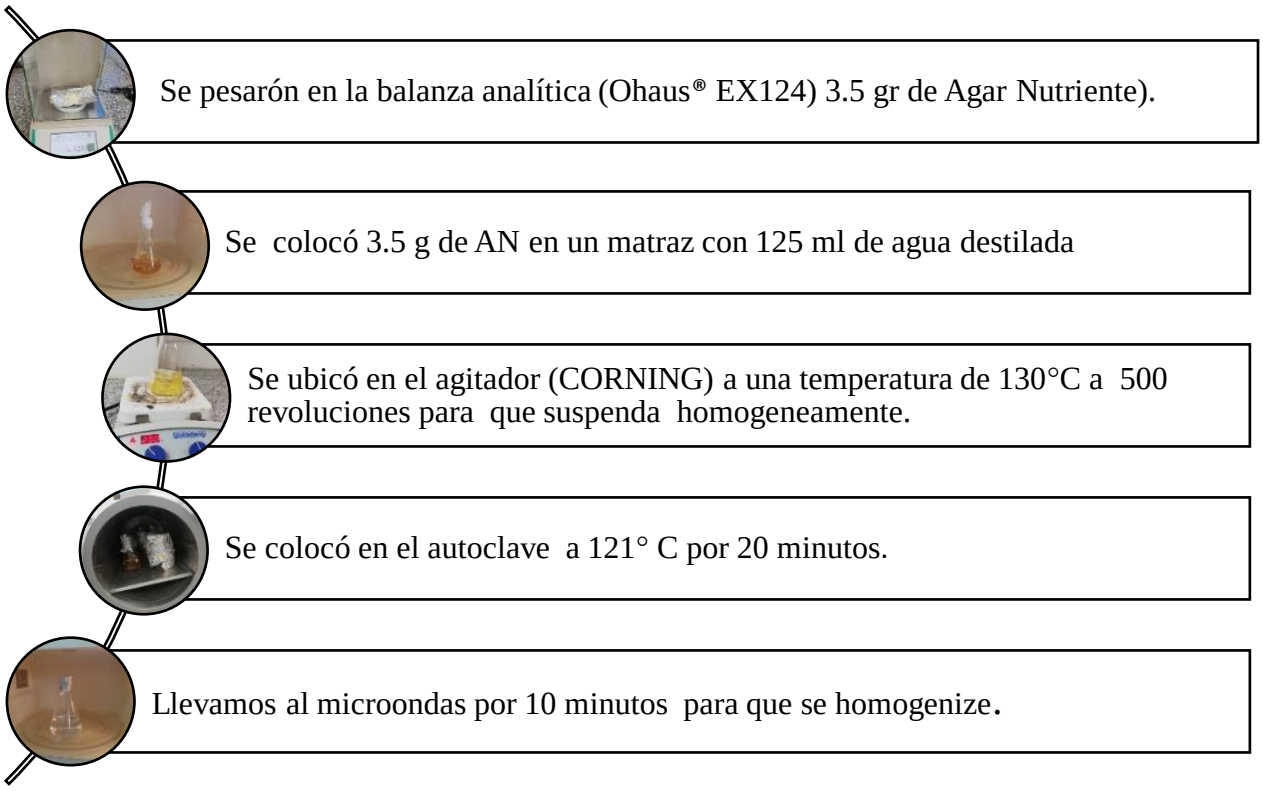
Posteriormente, se ubicó en la cabina de flujo y se encendió la lámpara de UV por 15 minutos y después con la ayuda de una micropipeta se procedió a la siembra en el medio BHI se colocó en una incubadora (red LINE) a 28°C por 15 días.

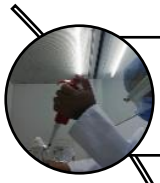
Con la ayuda de la micropipeta de 10 microlitros se tomó una pequeña muestra y se ubicó

en las cajas de Petri con medio de cultivo Agar Nutriente y se procedió a realizar la siembra por agotamiento con un asa estéril. Después se envolvieron las cajas de Petri en papel Kraft y se cubrieron con papel alumio, y se colocaron en una incubadora que está a 28° centígrados.

Ilustración 1 .

Esquema de preparación del medio de cultivo para la obtención de la liofilización de F. oxysporum f. sp. cubense raza 4 R4T.





Se colocó en la cámara de flujo para desinfectar, el agar 121° C el , asa, mecheros, cajas de Petri de 90 mm, pipetas, punta de pipetas, prendemos el UV por 15 minutos.



Se desinfectó la cámara de flujo con alchol al 70% , se encendio la luz UV por el lapso de 15 minutos



Encendieron los mecheros y se utilizó el medio de cultivo AN en 5 cajas de petricas y se dejó que se solidificaron por (1 hora).



Se tomarón 10 µl con una pipeta de la muestra de *E. coli* (Top 10) y colocaron en la parte superior del agar medio AN y se dejó secar.



Se realizarón la siembra mediante el método de agotamiento por estrías.



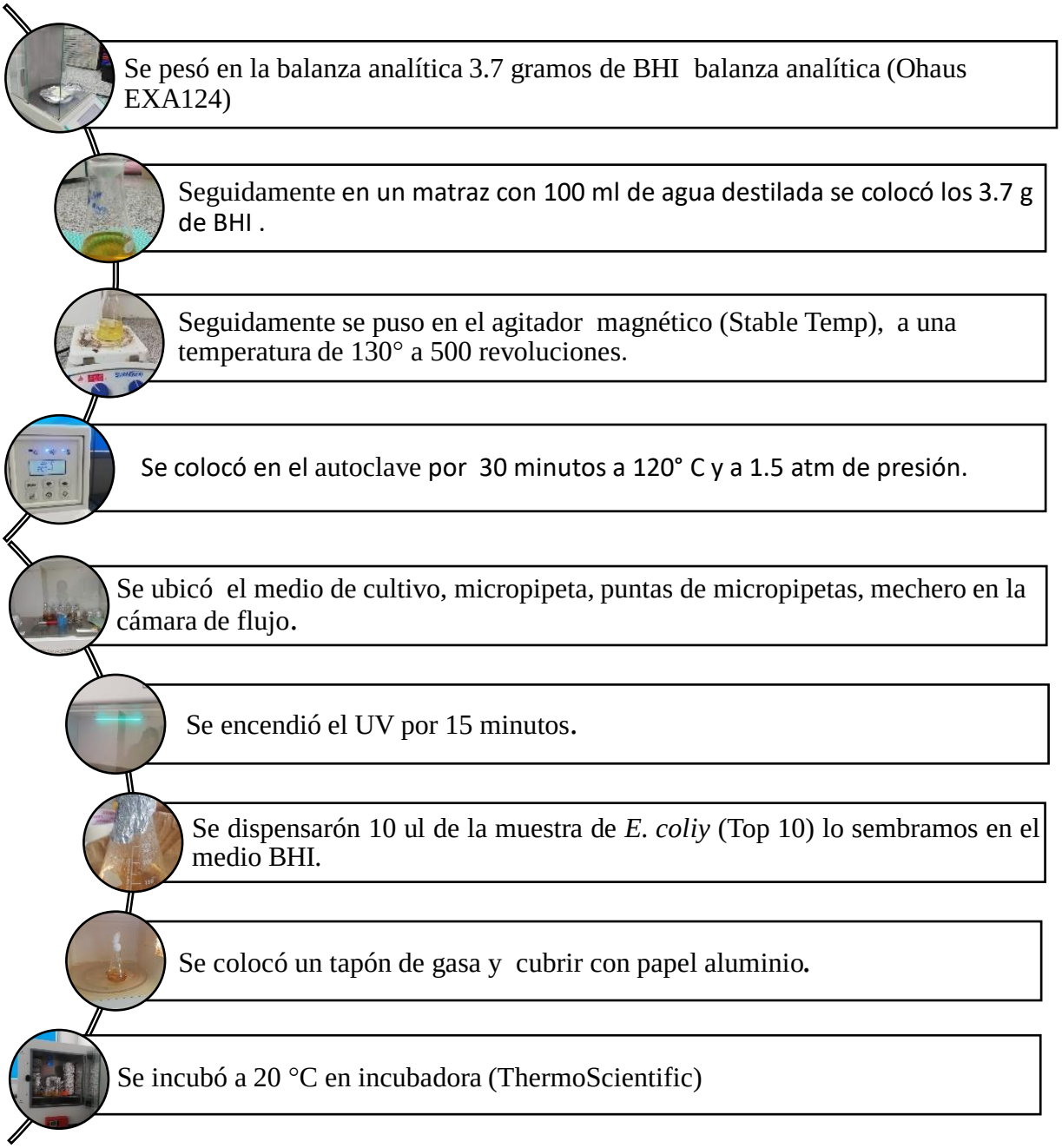
A la caja de petri se selló colocandole cinta Parafilm.



La caja de Petri se envolvieron en papel aluminio y colocararon en la incubadora 28° C.

Ilustración 2.

Esquema de preparación del medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) para la obtención de biomasa bacteriana de la cepa E. coli (ESPE)



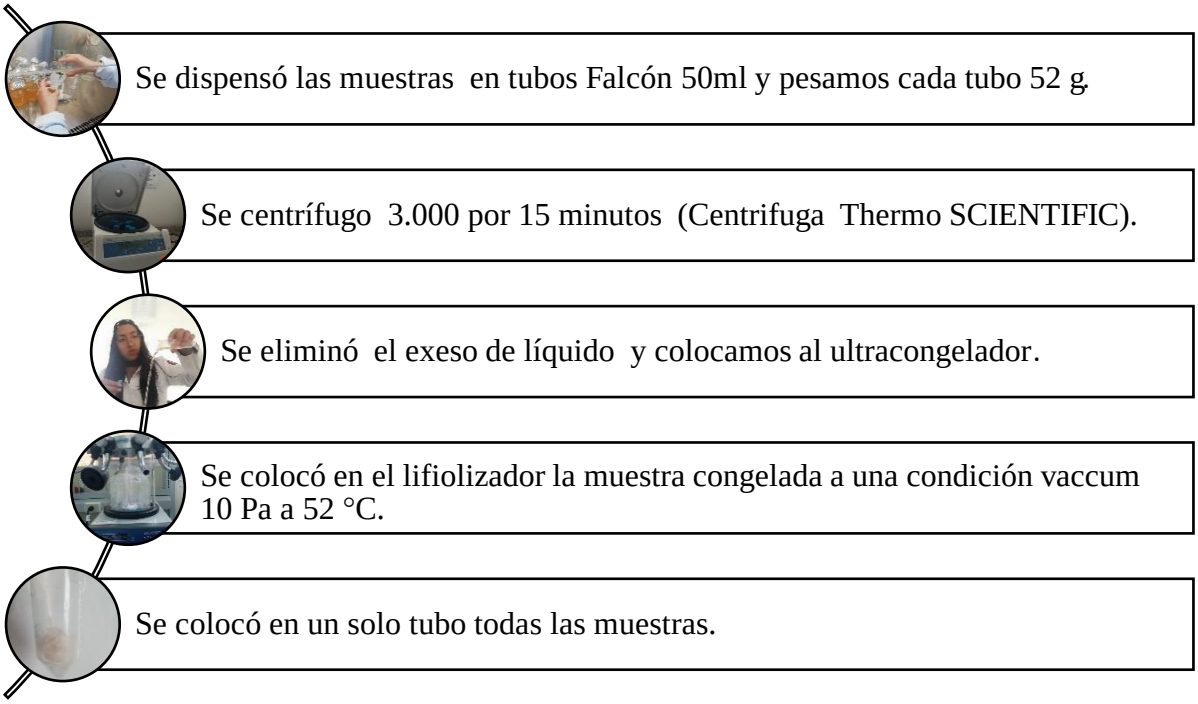
2.6.2 Protocolo de centrifugación y liofilización de la biomasa de E. coli.

Se dispensó el medio de cultivo líquido BHI en 20 tubos Falcon de 50 mL con un peso de 52 gramos todos por igual para colocar en la centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos recuperando el precipitado en la base de los tubos y descartando el líquido y obteniendo el sobrenadante.

Se colocó en los tubos falcón para colocar en el ultracongelador -80°C, por 24 horas, se selló con papel filtro las tapas de los tubos y se colocó en la liofilizadora a condiciones de vacío (-10 Pa a -52 °C).

Ilustración 3.

Esquema de preparación para la centrifugación y liofilización.

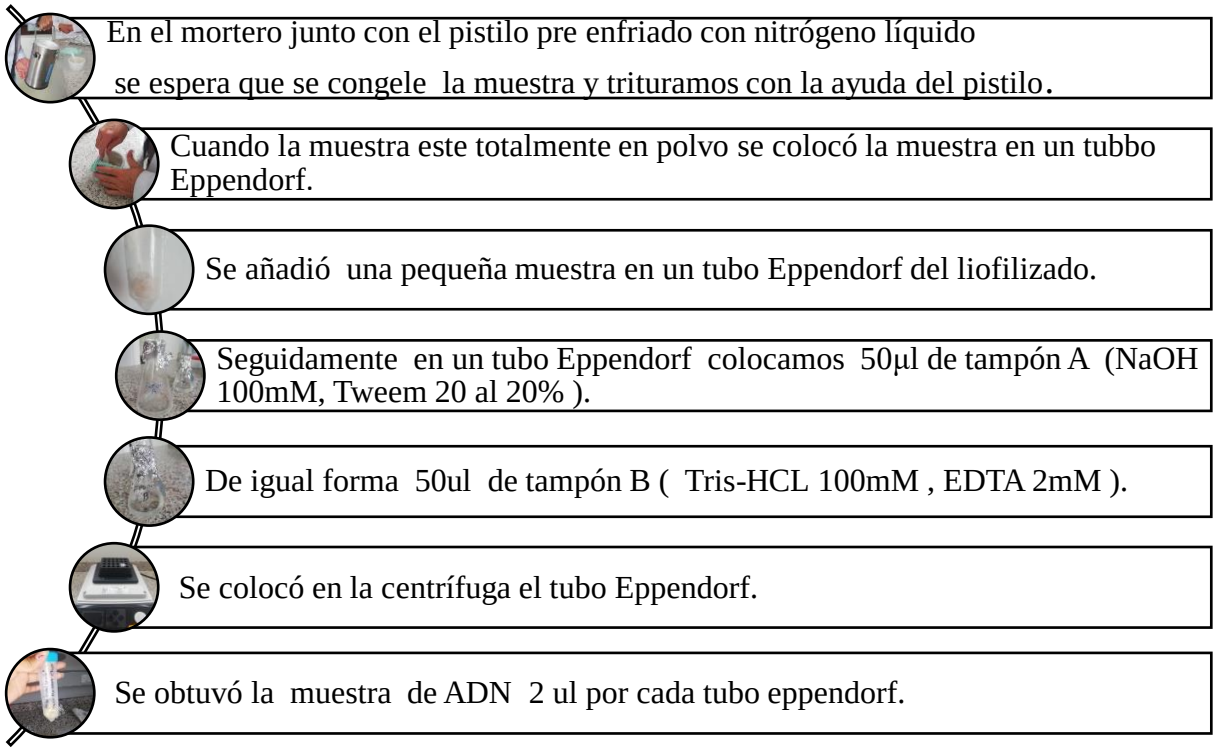


2.6.3 Protocolo de extracción del ADN

Para la extracción del ADN se trituró la biomasa bacteriana liofilizada en un mortero de porcelana se utilizó nitrógeno líquido hasta obtener un polvo homogéneo y fino. Se colocó este polvo en la parte inferior de un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se realizó 50ml de tampón A (NaOH 100mM, Tween 20 al 20%) y de igual forma 50ml de tampón B (Tris-HCL 100mM, EDTA 2mM), finalmente colocamos la muestra en la centrífuga (Thermo SCIENTIFIC), retiramos el sobrenadante y así se obtuvo la muestra de ADN.

Ilustración 4.

Esquema para la extracción de ADN de Fusarium oxysporum f. sp. cubense R4T.

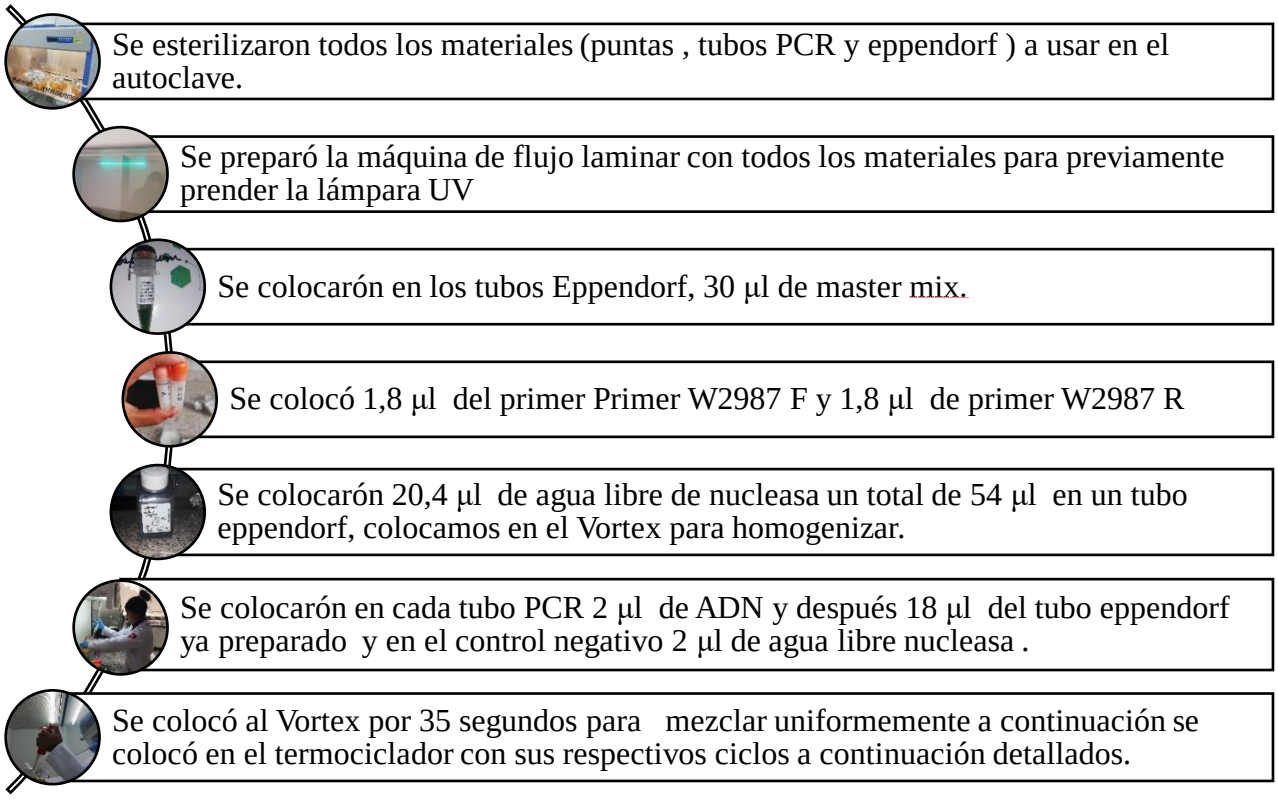


2.6.4 Protocolo de amplificación

Se esterilizó en la autoclave (STERMAX) todo el material que usamos: puntas de micropipetas (0.5µl a 10 µl y de 100 µl a 1000 µl), vasos de precipitado (500ml) sellados, tubos de PCR y tubos eppendorf, pinzas metálicas. Todo este material se pasó a la cámara de flujo laminar y se prendió la lámpara de UV por 15 minutos. Se realizó los respectivos cálculos para las tres reacciones donde se colocaron 30 µl de Dream tag mastermix, 1.8 µl de primer Foward, 1.8 µl de primer Reverse y 20.4 µl de agua estéril libre de nucleasa para un total de 54 µl. Se verificó las cantidades, se colocó en cada tubo de PCR 2 µl del ADN excepto en el control negativo en el cual se coloca 2 µl de agua nucleasa y después 18 µl de la mezcla que se realizó.

Ilustración 5.

Esquena de protocolo de amplificación.



Para la amplificación con los primers W2987R W 2987 R Y Foc TR4, se utilizó el siguiente programa.

Figura 9.

Principales etapas de una reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR).

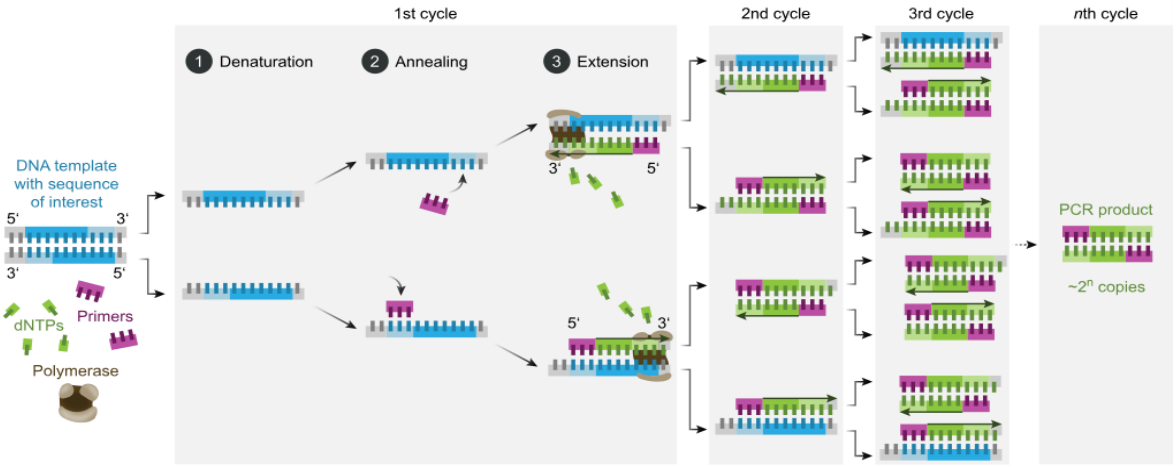


Tabla 7.

Tiempos en el termociclador

Ciclos	Tiempo
Desnaturalización inicial	Es el tiempo que el termociclador mantiene la muestra a la temperatura más alta (típicamente entre 90-95°C) para romper los enlaces de hidrógeno en el ADN y separar las hebras.
Desnaturalización	Es la velocidadad a la que el termociclador calienta la muestra hasta alcanzar la temperatura de desnaturalización.

Hibridación (Anneling)	Es el tiempo que el termociclador mantiene la muestra a la temperatura óptima para que los cebadores se unan a las secuencias complementarias en el ADN (típicamente entre 50-65°C).
Extensión final	Es el tiempo que el termociclador mantiene la muestra a la temperatura óptima para que la polimerasa extienda las hebras de ADN (típicamente entre 68-72°C). Es la velocidad a la que el termociclador calienta la muestra desde la temperatura de alineamiento hasta la temperatura de extensión.

Fuente: (Ramirez, 2022)

Tabla 8.

Condiciones en el termociclador para la amplificación mediante PCR utilizando los juegos de primers W2987R-W2987F y Foc TR4F-FocTR4R.

Temperatura	Tiempo	30 ciclos
94°C	2 minutos	Desnaturalización inicial
94°C	40 segundos	Desnaturalización
60°C	40segundos	Hibridación
72°C	1 minutos	Extensión
72°C	10 minutos	Extensión final

El producto de PCR obtenido se visualizó en un gel de agarosa de 1.5%, y se obtuvo una banda de ADN de aproximadamente 452 pb (primers W2987), 463 pb (primers Foc R4T).

Programa editado en el termociclador para el desarrollo de PCR tiempo final cuando se utilizaron los primers TEF.

Tabla 7.

Condiciones en el termociclador para la amplificación mediante PCR utilizando los juegos de primers EF1 y EF2.

Temperatura	Tiempo	35 ciclos
94°C	2 minutos	Desnaturalización inicial
94°C	45 segundos	Desnaturalización
60°C	45 segundos	Hibridación
72°C	1 minuto 30 segundos	Extensión

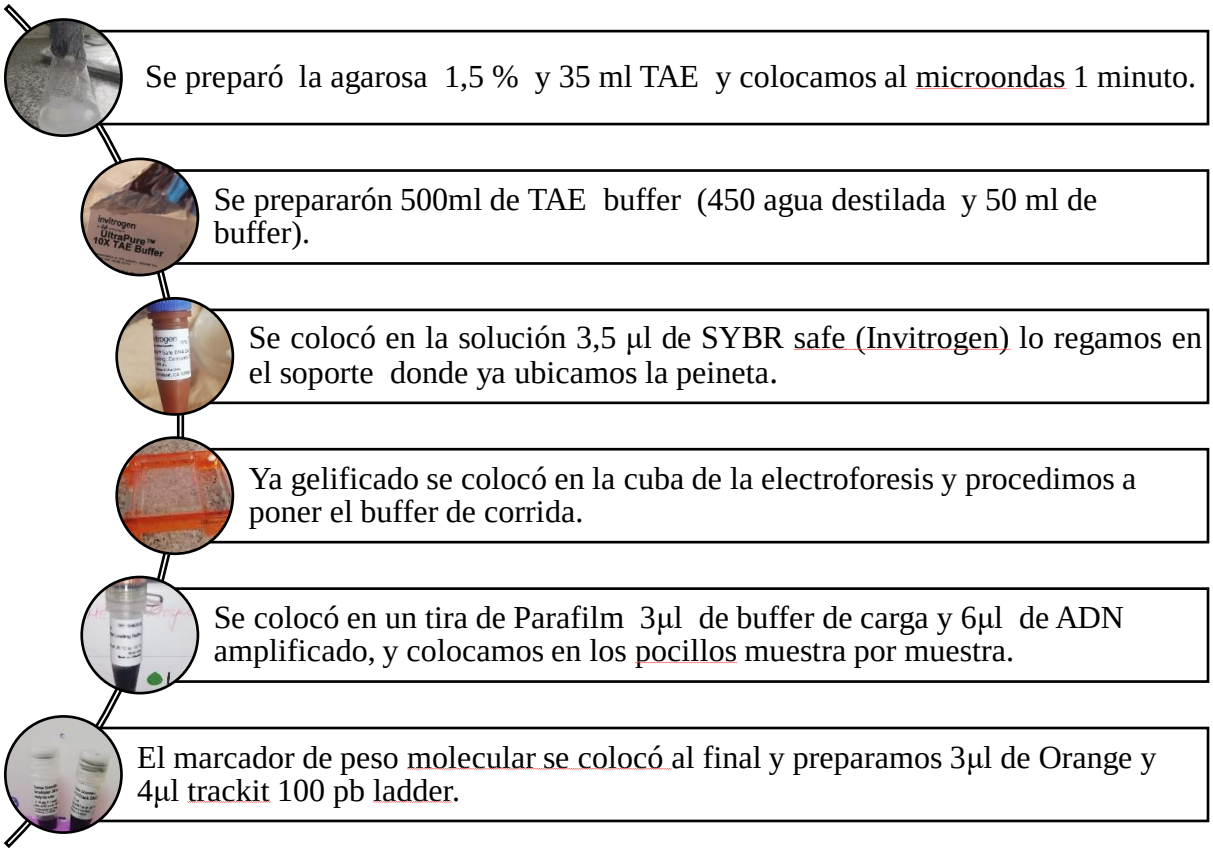
El producto de PCR obtenido se visualizó en un gel de agarosa de 1%, y se obtuvo una banda de ADN de aproximadamente 700 pb.

2.6.5 Protocolo de electroforesis en geles de agarosa

Pesamos 0.52 gramos de agarosa y colocamos en un matraz con 35ml de TAE BUFFER colocamos al microondas por 1 minuto. Después ubicamos el gel obtenido en la cuba de electroforesis. En una cámara de electroforesis de la marca Thermo Scientific con unas dimensiones de 24.5 x18x19.5cm que nos da un tamaño de gel de 12 x14cm, disponibilidad de 10 muestras, o de la marca Bio Rad de dimensiones 9.2x25.5x5.6 con un tamaño de gel de 7x7 con disponibilidad para 12 muestras con la cantidad de 400 ml de buffer de corrida. Se analizaron tres diferentes concentraciones de agarosa (1%,1.5%, y 2%). Con su correspondiente peineta y con una micropipeta colocamos 3.5 µl SYBR SAFE, se deja solidificar. Posteriormente se colocó 500 ml del Buffer de corrida (450 ml de agua destilada y 50 ml de TAE 10X). Además, colocamos la cinta Parafilm en el mesón para preparar las muestras que se aplicarán en los pocillos del gel tomando 3 µl de buffer de carga y 6 µl de muestra de ADN con la micropipeta de 10 µl y colocamos en los pocillos y al final ubicamos el marcador de peso molecular.

Ilustración 6.

Esquema de protocolo para la electroforesis.



2.6.6 Visualización de las bandas de ADN

Se espera ver el tamaño correcto de las bandas dependiendo de los tres pares de Primers utilizados (W2987 F, W2987 F; FocTR4-F; FocTR4-R; EF1; EF2).

Tabla 9.

Talla de los productos amplificados esperados por los juegos de primer (W2987 F, W2987 F; FocTR4-F; FocTR4-R; EF1; EF2).

Primers	Pares de bases
W2987 F	452 pb

W2987 R	
Foc TR4 -R FocTR4-R	463 pb
EF1 EF2	700 pb

CAPITULO III

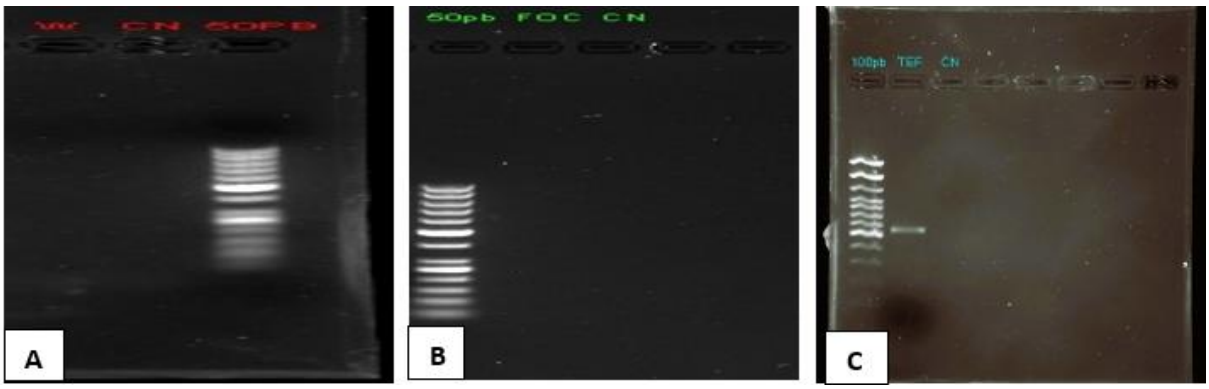
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de la influencia de la concentración de agarosa sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *Fusarium* o*xysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR.

En el gel al 1% no se logró una buena visualización de las bandas amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T. Esto se pudo deber a que requería menor tiempo de corrida de la utilizada (1 hora y 80 Voltios) para visualizar las bandas con los juegos de primer W2987-FY W2987-R **(figura 10, A).** Con la pareja de primer Foc TR4-F Y Foc TR4-R no se pudo observar ninguna banda **(figura 10, B)** lo cual pudo deberse a que requería menor tiempo de corrida establecido (1 hora y 80 Voltios) para visualizar las bandas. Cuando se utilizó el juego de primer EF1 y EF2 en geles de agarosa al 1% se disminuyó el tiempo de corrida a 45 minutos a 100 Voltios y se logró visualizar una banda de aproximadamente 700 pb **(figura 10, C).**

Figura 10.

Gel de agarosa al 1% sin visualización de bandas de ADN de Fusarium oxysporum f. sp. cubense R4T *mediante PCR. Juego de primer* W2987-FY W2987-R (A); *juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).*



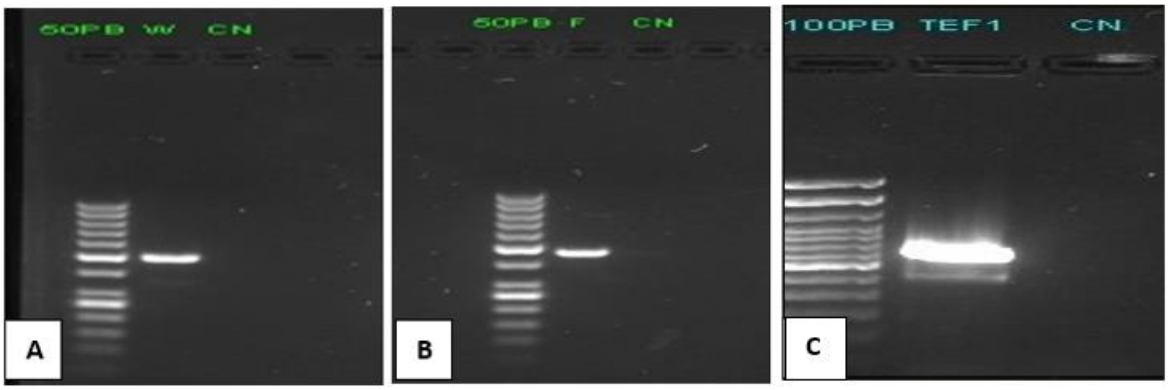
Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas.

(Li et al., 2013) señalaron en su investigación que los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% obteniendo una banda amplificada de en la especie *Fusarium oxysporum* cubense f. sp. lo cual es similar a lo obtenido en el presente estudio. Asimismo, Geiser et al., (2004) lograron visualizar una banda de ADN de 700 pb con el juego de primers EF1 Y EF2 al usar geles de agarosa al 1%.

Al utilizar la concentración de 1.5% y el juego de primer W2987-F Y W2987-R se logró visualizar una banda de aproximadamente 452 pb **(figura 11, A)** con un tiempo menor de corrida (1 hora y 80 Voltios). Con el primer Foc TR4-F Y Foc TR4-R al 1.5% se logró visualizar una banda de aproximadamente 463 pb **(figura 11, B)**. Sin embargo, cuando se utilizó la concentración de 1.5 % de agarosa con el juego de primer EF1 Y EF2 se visualizó una doble banda superpuesta de aproximadamente 700 pb (**figura 11, C)**

Figura 11.

Gel de agarosa al 1.5% visualización de bandas de ADN de Fusarium oxysporum f. sp. cubense R4T *mediante PCR.* El juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers *Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).*



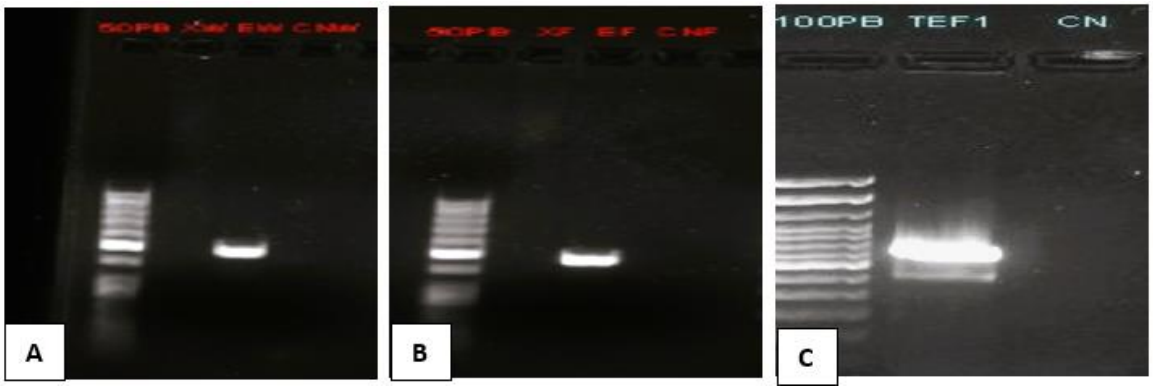
Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas.

(Li et al., 2008) mencionaron en su investigación que los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% obteniendo una banda amplificada de la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T lo cual es similar a lo obtenido en el presente estudio. Similarmente, otros autores han logrado obtener bandas de 463 pb con el primer FOC TR4-F Y FOC TR4 (Dita et al., 2010) y de 452 pb con el primer W2987-R Y W2987-F según (Li et al., 2013) utilizando geles con una concentración de agarosa al 1,5%.

Con la concentración al 2% de agarosa se pudieron observar bandas correspondientes a los juegos de primers W2987-FY W2987-R **(figura 12, A)**; Foc TR4-F Y Foc TR4-R **(figura 12, B)** y EF1 y EF2 **(figura 12, C)**. Sin embargo, las bandas correspondientes al marcador de peso molecular fueron estrechas o muy unidas lo cual no es recomendable para tener una correcta visualización de las bandas amplificadas.

Figura 12.

Gel de agarosa al 2.0 % visualización de bandas de ADN de Fusarium oxysporum f. sp. cubense *R4T mediante PCR.* El juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers *Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).*



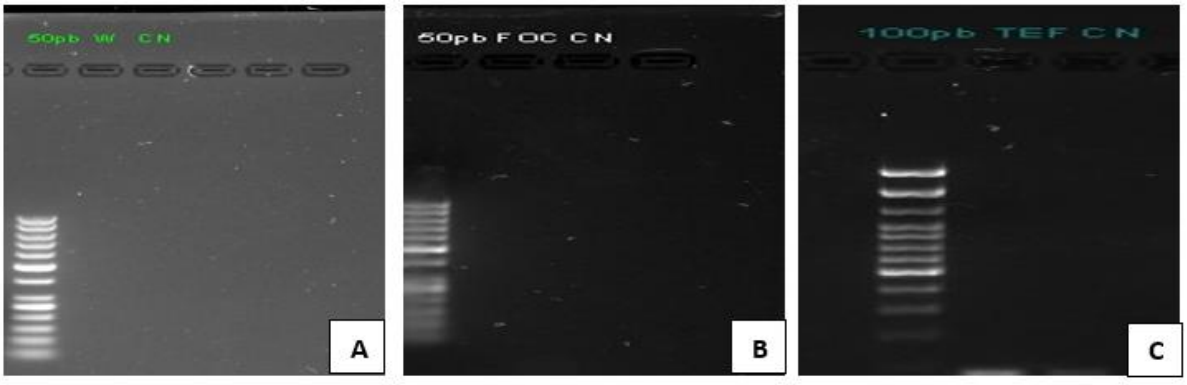
Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas.

Por otra parte Li et al., (2008) mencionaron en su investigación que los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2% obteniendo una banda amplificada correspondiente a la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4T lo cual es similar a lo obtenido en el presente estudio.

3.2. Evaluación de la influencia de la temperatura de apareamiento de los cebadores sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T mediante PCR.

Cuando se utilizó la temperatura de hibridación (annealing) de 59°C no se observaron bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR al utilizar los juegos de primers W2987-F y W2987-R **(figura 13 A)**, FOC TR4 -F y FOC TR4-R **(figura 13, B)** y EF1 Y EF2 **(figura 13 C).** Esto pudo deberse a que esta temperatura no fue la adecuada para que los primers se unieran de manera efectiva a las secuencias dianas.

Figura 13. *Temperatura de hibridación (annealing) de 59°C no se observaron bandas de ADN de Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T *amplificadas mediante PCR. El juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).*

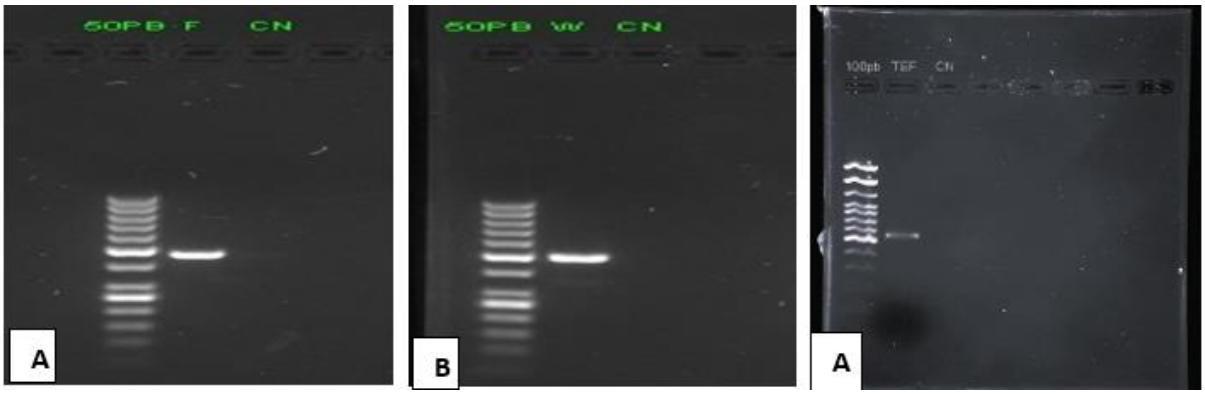


Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas.

Cuando se utilizó la temperatura de hibridación (annealing) de 60°C se observaron bandas amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR al utilizar los juegos de primers W2987-F y W2987-R **(figura 14, A)**, FOC TR4 -F y FOC TR4-R **(figura 14, B)** *y* EF1 Y EF2 **(figura 14, C)** observó la banda de 700pb**.**

Figura 14.

Temperatura de hibridación (annealing) de 60°C se observaron bandas de ADN de Fusarium oxysporum f. sp cubense R4T *amplificadas mediante PCR primer.* El juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers *Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).*



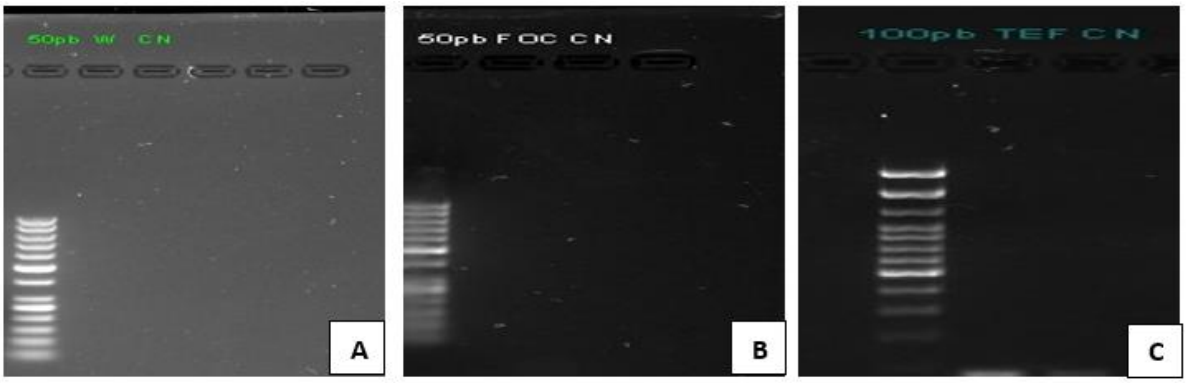
Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas.

Con la temperatura de hibridación (annealing) de 61°C no se observaron bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR al utilizar los juegos de primers W2987-F y W2987-R **(figura 15, A)**, FOC TR4 -F y FOC TR4-R **(figura 15, B)** y EF1

Y EF2 **(figura 15, C).** Esto pudo deberse a que esta temperatura debe ser lo suficientemente baja para que los primers se unan selectivamente a las secuencias objetivo, pero lo suficientemente alta para evitar uniones no específicas.

Figura 15.

Temperatura de hibridación (annealing) de 61°C no se observaron bandas de ADN de Fusarium oxysporum f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR primer. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).



Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas.

De la literatura revisada no se encontraron trabajos donde se haya utilizado la temperatura de hibridación de 59°C ni 61°C para amplificar fragmentos de ADN utilizando los juegos de primers W2987(F, R), Foc TR4 (F, R), EF1 y EF2.

Magdama et al., (2020) mencionaron en su investigación que las condiciones de temperatura de hibridación (annealing), donde los primers se unieron de manera óptima a las secuencias de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T fue cuando utilizaron la temperatura de 60°C, lo cual coincide con nuestros resultados. Al parecer con las temperaturas de 59°C y 61°C, los primers no se unieron de manera eficiente a la secuencia de ADN objetivo. Es importante tener en cuenta que la PCR es una técnica altamente sensible y pequeñas

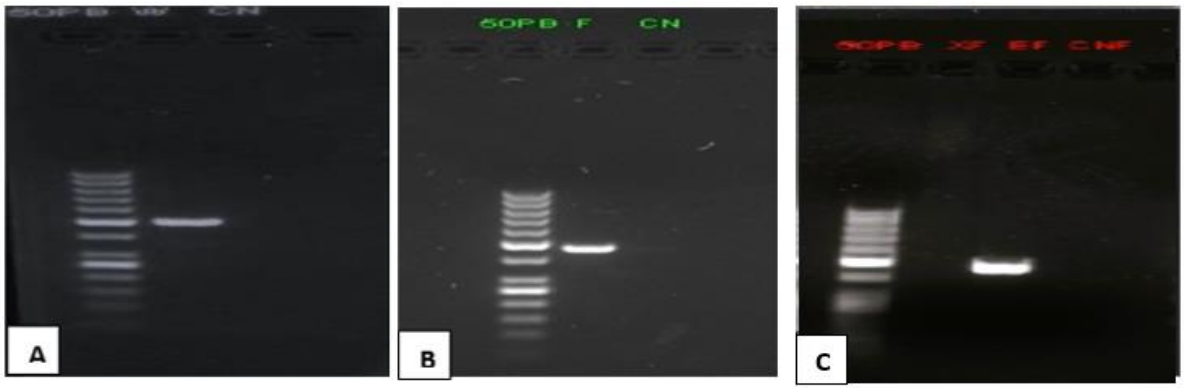
variaciones en las temperaturas de hibridación pueden tener un impacto significativo en los resultados.

3.3. Determinación de la influencia del tipo de marcador de peso molecular sobre la visualización de bandas amplificadas de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR.

Los marcadores moleculares se usan dependiendo de la talla del amplicón que se desea obtener, en este caso se usó el marcador de peso molecular 50 pb con los juegos de primer W2987-F, W2987-R **(figura 16, A)** y FOC TR4-F Y FOCTR4-R **(figura 16, B)** debido a que ellos deben producir fragmentos de ADN amplificados con una talla más reducida (452 pb y 463 pb respectivamente). Si embargo, para el amplicón obtenido con los juegos de primer EF1 Y EF2 **(figura 16, C)** que generaron una banda de aproximadamente 700 pb, fue preferible utilizar el marcador de peso molecular 50 pb, pues su despliegue en las bandas correspondientes a dicha talla se ven menos desplegadas.

Figura 16.

Marcador de 50 pb se observó la banda de ADN de Fusarium oxysporum f. sp cubense R4T amplificadas mediante PCR. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C)



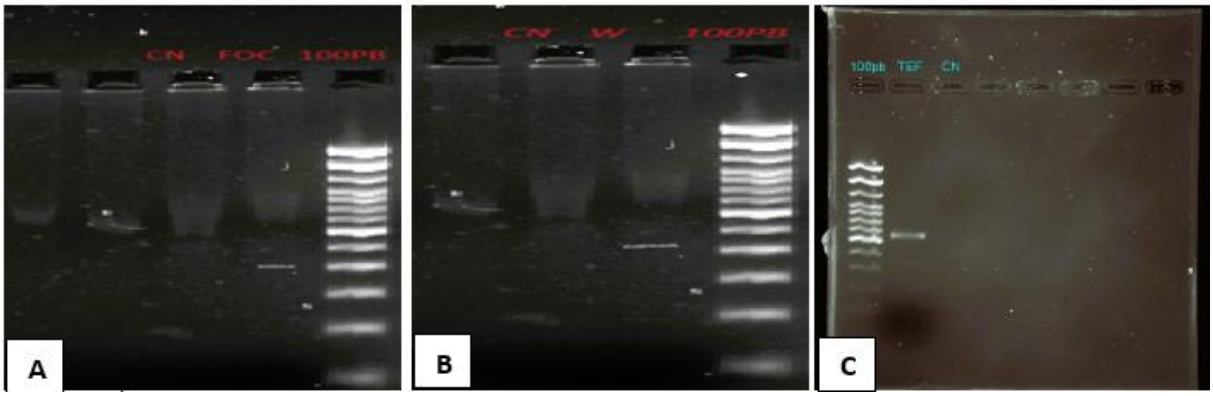
Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF-*

Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas; **50pb** Marcador de peso molecular (Tracklt ™ 50bp, Invitrogen), juego de primers *W2987-F y W2987-R (A), Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y EF1 y EF2 (C).*

Cuando se usó el marcador molecular de 100 pb para el primer W2987-F Y W2987-R, **(figura 17, A)** se visualizó una banda tenue pero definida con una talla de 452 pb aproximadamente. Asimismo, para el juego de primer FOC TR4-F Y FOC TR4-R, **(figura 17, B)** se visualizó una banda definida y tenue, con una talla de aproximadamente 463 pb. Sin embargo, para el juego de primer EF1 Y EF2 **(figura 17, C)** se observó una banda amplificada de 700 pb aproximadamente que fue mucho más nítida. Para la banda de 700 pb se pudo comprobar que es más factible usar el marcador de peso molecular 100 pb porque este permitió un mejor despliegue entre las bandas.

Figura 17.

Marcador de peso molecular 100 pb se observó la banda de ADN de Fusarium oxysporum f. sp cubense R4T *amplificadas mediante PCR.* Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers *Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).*



Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas; 100 pb Marcador de peso molecular (Tracklt ™ 50bp, Invitrogen), juego de primers *W2987-F y W2987-R (A), Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y EF1 y EF2 (C).*

Respecto al uso de marcadores de peso molecular, Tecámac, (2018) visualizó bandas de ADN correspondientes a *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense R4T utilizando los mismos juegos de primer, usando el marcador de peso molecular TrckIt ™ 100pb DNA Ladder de Invitrogen, lo cual es similar a lo referido en el presente estudio.

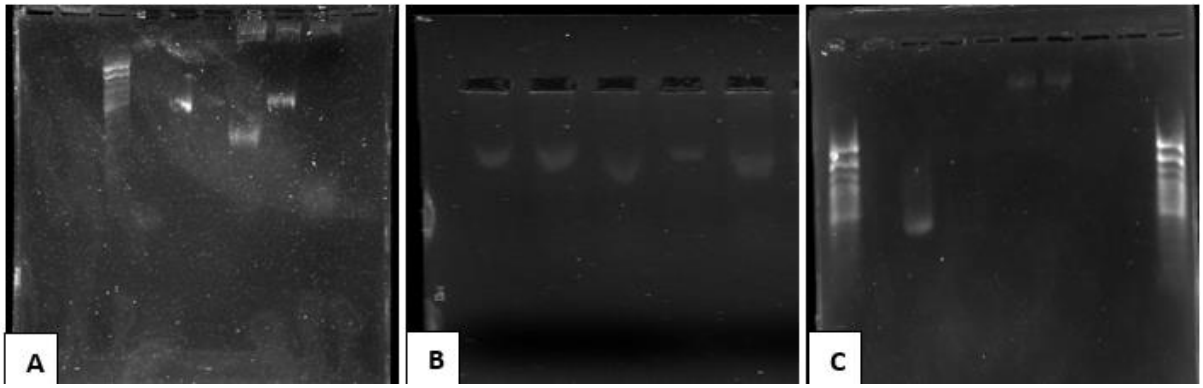
(Oloriz et al., 2021) señalaron en su investigación que se pudo observar las bandas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R1 con diferente juego de primers SIX6b-210-F y SIX6b-210-R donde se utilizó el marcador molecular GeneRuler 50pb DNA Ladder, el cual fue similar. Sin embargo, el marcador de peso molecular utilizado dio como resultado diferente talla de banda de ADN esto es porque se trabajó con la detección de *Fusarium oxysporum* cubense f. sp. raza 1 que requiere del uso de otros juegos de primer mientras que en el presente estudio se trabajó con ADN procedente de la RAZA 4 de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense.

3.4. Selección del tipo de agente intercalantes que permita una mejor visualización de bandas a amplificadas de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T mediante PCR.

Al utilizar el agente intercalante de bromuro de Etidio con el juego de primer W2987-F Y W2987-R **(figura 18, A),** FOC TR4-F Y FOC TR4-R **(figura 18, B)** y EF1 Y EF2 **(figura 18, C),** no se observaron bandas amplificadas nítidas, lo cual pudo deberse a la cantidad baja de ADN utilizada o a la baja sensibilidad de este método. Además, en la actualidad el bromuro de etidio se ha dejado de usar debido a los riesgos que implica para la salud por considerarse un agente mutagénico.

Figura 18.

Agente intercalantes Bromuro de etidio no se pudo observar una visualización de bandas a amplificadas de ADN de Fusarium oxysporum f. sp. cubense R4T *mediante PCR.* Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers *Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).*

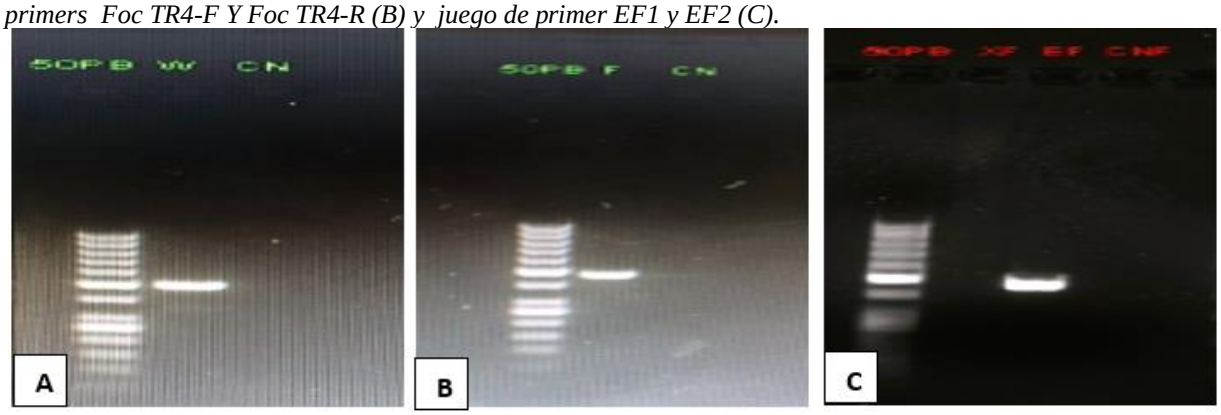


Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas; 100 pb Marcador de peso molecular (Tracklt ™ 50 bp, Invitrogen), juego de primers *W2987-F y W2987-R (A), Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y EF1 y EF2 (C).*

Por otra parte, al utilizar el agente intercalantes SYBR safe con el juego de primer W2987-F y W2987-R **(figura 10, A)** se logró observar una banda de aproximadamente 452 pb. Asimismo, con el juego de primer FOC TR4-F Y FOC TR4-R **(B)** se observó una banda cercana a los 463 pb. Finalmente, con el juego de primer EF1 y EF2 **(C)** se visualizó una banda de 700 pb. El SYBR Safe se considera un agente intercalante menos dañino y se ha diseñado para minimizar los riesgos asociados con el manejo y la eliminación de sustancias químicas peligrosas, ayuda a visualizar y detectar el ADN amplificado al unirse al ADN de doble cadena y emitir fluorescencia cuando se expone a luz ultravioleta.

Figura 19.

Agente intercalantes Syber safe se pudo observar una visualización de bandas a amplificadas de ADN de Fusarium oxysporum f. sp. cubense R4T mediante PCR. Juego de primer W2987-FY W2987-R (A); juego de primers Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y juego de primer EF1 y EF2 (C).



Nota **W**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer W2987-F y W2987-R. **F**- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer *Foc TR4-F Y Foc TR4-R. TEF*- Productos amplificados correspondiente al uso del juego de primer EF1 y EF2. **CN**- Control negativo que comprendió agua ultrapura libre de nucleasas; 100 pb Marcador de peso molecular (Tracklt ™ 50 bp, Invitrogen), juego de primers *W2987-F y W2987-R (A), Foc TR4-F Y Foc TR4-R (B) y EF1 y EF2 (C).*

Autores como Oloriz et al., (2021) utilizaron bromuro de etidium para visualizar bandas de ADN amplificadas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense lo cual fue similar a parte de los resultados obtenidos en el presente trabajo a pesar de que en nuestro caso se utilizó ADN de la raza 4T.

Para la visualización de las bandas de ADN amplificadas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense R4T en el presente trabajo se utilizó el SYBR Safe, el cual de la literatura revisada no se encontró trabajos que hayan utilizado este agente intercalante para visualizar bandas de Foc R4T.

(Tecámac, 2018) utilizó GelRed™ Biotum, para visualizar bandas de ADN amplificadas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense lo cual es similar a los resultados obtenidos

ya que es una alternativa al bromuro de etidio, con la ventaja de ser menos tóxico y más seguro de usar.

(Prachaiboon et al., 2022) En la investigación realizada, se utilizó el fluoruro SYBR Green para visualizar las bandas de ADN amplificadas de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas. Esto se debe a que el estudio se enfocó en evaluar un objetivo diferente, en este caso, la especificidad de los cebadores (primers) utilizados en la reacción de PCR. La elección de los cebadores adecuados es fundamental para asegurar la detección específica del patógeno de interés. Una evaluación exhaustiva de la especificidad de los primers empleados es crucial para evitar resultados falsos positivos o falsos negativos en el diagnóstico de la enfermedad.

Sin embargo, el estudio realizado utilizó diferentes juegos de primers RPB11F/RPB11R y Foc1-0422F1/Foc1-0422R1, la cual se realizó ensayos en tiempo real para la visualización de bandas de ADN amplificadas de Fusarium oxysporum f.sp. cubense R4T.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

1. Con la concentración de 1.5% de Agarosa se lograron visualizar los fragmentos de ADN amplificados de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T a partir del uso de los primers: W2987 R, W2987 F y FocTR4-F, FocTR4-R.

2. La temperatura e hibridación de 60°C permitió la visualización de los fragmentos de ADN amplificados de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T a partir del uso de los primers: W2987 R, W2987 F y FocTR4-F, FocTR4-R y EF1, EF2.

3. Para los protocolos amplificados de ADN de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T), con los primers W2987 F y W2987 R así como y FocTR4-F, FocTR4-R se visualizaron mejor con el marcador de peso molecular 50 pb (Tracklt TM 50 pb, Invitrogen), mientras que para los fragmentos de ADN amplificados correspondientes a los primers EF1, EF2, se visualizaron mejor con el marcador de peso molecular 100 pb (Tracklt TM 100 pb, Invitrogen).

4. El agente intercalante SYBR safe permitió una correcta y nítida imagen de los fragmentos de ADN amplificados *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T), utilizando los primers W2987 R, W2987 F y FocTR4-F, FocTR4-R y EF1, EF2.

4.2 Recomendaciones

1. Se recomienda utilizar la técnica de extracción de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T a partir del uso de los primers: W2987 R, W2987 F y FocTR4-F, FocTR4, donde se utilizó 3.5gr de Agar Nutriente en 125 ml de agua destilada y se dispenso en 5 cajas petricas y con la ayuda de una asa se realizó una siembra por método de agotamiento por estrías con la muestra de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T , a partir de esta

técnica se realizó un medio de cultivo líquido con 3.7 gr de (BHI) en 100 ml de agua destilada, donde se dispenso en 7 matraces y se colocó 10 µl de la muestra solida se dejo reposar en la incubadora a 20°C por 20 días, después se dispensó en tubos Falcón de 50 ml con un peso de 52 g y se centrífugo por 15 minutos, seguidamente se eliminó el exceso y congelamos la muestra a 52°C, se colocó en el liofilizador donde se obtuvo una muestra seca, por último en un mortero enfriamos con nitrógeno líquido y lo trituramos, se colocó en un tu eppendorf 50 µl de tampón A y tampón B obteniendo el ADN.

2. Se recomienda utilizar en los programas de PCR la temperatura de hibridación de 60°C para lograr una correcta visualización de los fragmentos de ADN amplificados de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T a partir del uso de los primers: W2987 R, W2987 F y FocTR4-F, FocTR4-R y EF1, EF2 utilizando la técnica de la amplificación, una vez obtenido la muestra de ADN se procedió a esterilizar todos los materiales, se colocó en un tubo PCR (30 µl de master mix, 1,8 µl de Primer 20,4 µl de agua nucleasa y por ultimo 2 µl de ADN, seguidamente se mezcla con la ayuda de un vortex y por último se coloca en el termociclador .

3. Para visualizar los fragmentos de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T a partir del uso de los primers: W2987 R, W2987 F y FocTR4-F, FocTR4 recomiendo utilizar la concentración de 1.5% de Agarosa con 35 ml de TAE buffer, una vez gelificado se coloca en la cuba de electroforesis con 500 ml de TAE buffer a un tiempo de corrida de 45minutos a 100 Voltios.

4. Se recomienda utilizar la técnica, según las tallas estimadas de los fragmentos amplificados de ADN de *F. oxysporum* f. sp. cubense R4T usando los primers W2987 F y W2987 R así como y FocTR4-F, FocTR4-R recomiendo usar el marcador de peso molecular 50 pb (Tracklt TM 50 pb, Invitrogen) mientras que para los fragmentos de

ADN amplificados correspondientes a los primers EF1, EF2 utilizar el marcador de peso molecular 100 pb (Tracklt TM 100 pb, Invitrogen).

5. Recomiendo utilizar la técnica del agente intercalante el SYBR safe 3,5 µl en la solución de agarosa para observar bandas nítidas de los fragmentos de ADN amplificados *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense raza 4 (R4T).

Referencias Bibliográficas

AgroAmerica. (2023). AgroAmerica Variedad de Bnano Cadvendish. Obtenido de https://agroamerica.com/noticias/avendish-la-variedad-mas-famosa-de-banano/#:~:text=El%20m%C3%A1s%20cultivado%20y%20consumido,su%20alto%20contenido%20de%20fibra.

AGROCALIDAD. (2019). Guía de identificación Foc R4T. AGROCALIDAD .

Agrocalidad. (2020). Guia de identificación de Foc R4T. Obtenido de https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/r4t12.pdf

Agrocalidad. (2021). AGENCIA DE REGULACIÓN Y ZOOSANITARIO. Obtenido de file:///C:/Users/xiomy/Downloads/7mo%20semestre/tesis/ROTAFOLIO-A1_compressed.pdf.

Agrocalidad. (2021). Ecuador sin *Fusarium* R4T. Agrocalidad. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmhttps://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2021/05/ROTAFOLIO-A1_compressed.pdf

Barajas, D. A. (2021). ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MOLECULAR DE *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense PRESENTE EN COLOMBIA. Obtenido de Universidad Nacional de Colombia: file:///C:/Users/xiomy/Downloads/1090424173.2021.pdf

Calcáneo, M. G. (2021). Reino Fungi. En Características generales de los dominios y los reinos. Portal Académico del CCH, UNAM. doi:https://portalacademico.cch.unam.mx/biologia2/caracteristicas-generales-dominios-y-reinos/reino-fungi

Castillo, H. (2016). Revista de pruebas bioquímicas . issu. doi:https://amp.issuu.com/hazelcastillo7/docs/revista_de_pruebas_bioqu__micas/19

Dita M. (2018). Marchitez del banano por *Fusarium*: conocimientos actuales sobre epidemiología y necesidades de investigación hacia el manejo sostenible de las enfermedades. Marchitez del banano por Fusarium: conocimientos actuales sobre epidemiología y necesidades de investigación hacia el manejo sostenible de las enfermedades. Obtenido de https://www.redalyc.org/journal/437/43761812020/html/

Dita, M., Barquero, M., Heck, D., Mizubuti, E., & Staver, C. (2018). Marchitez del banano por *Fusarium:* conocimientos actuales sobre epidemiología y necesidades de investigación para un manejo sostenible de las enfermedades (en línea). Fronteras en ciencia vegetal. Obtenido de https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01468.

EPPO. (2018). EPPO global database. *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Tropical race 4 (FUSAC4). Obtenido de https://gd.eppo.int/taxon/FUSAC4

FAO. (2022). Banano - Análisis del Mercado 2021. Roma. Obtenido de https://www.fao.org/3/cc1610es/cc1610es.pdf

Gonzabay, R. (2013). Cultivo del banano en el Ecuador. Afese, 113-142. Obtenido de https://www.fipcaec.com/index.php/fipcaec/article/view/848/1487

GRANADA, E. G., AMÉZQUITA, M. O., BAUTISTA, G. R., & VALENCIA, H. (2001). *Fusarium oxysporum* EL HONGO QUE NOS FALTA CONOCER. Obtenido de Departamento de Biología, Facultad de Ciencias,: file:///C:/Users/xiomy/Downloads/lcaballero,+63462-321772-1-SM%20(3).pdf

ICA. (2019). Instituto Agropecuario Colmbiano. Obtenido de https://www.ica.gov.co/getattachment/ICAComunica/PYP/Fusarium-R4T/Todo-sobre-el-fusarium.pdf.aspx?lang=es-CO

ICA. (2020). Instituto Colombiano Agropecuario . Obtenido de *Fusarium* R4t : https://www.ica.gov.co/icacomunica/pyp/fusarium-

r4t#:~:text=Es%20una%20enfermedad%20que%20afecta,que%20hace%20dif%C3%ADcil%20su%20manejo.

INIAP. (2013). INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS. Obtenido de http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mmusa/rbanano

Isaac Túnez Fiñana, M. d. (2020). Universidad de Córdoba (UCO). Obtenido de https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/09%20CENTRIFUGACION.pdf

Kalstein. (2022). Liofilizador. Obtenido de https://kalstein.co/liofilizador-que-es-para-que-sirve/

Kidane, E., & Laing, M. (2010). CONTROL INTEGRADO DEL MARCHATE POR FUSARIUM DEL PLÁTANO (MUSA SPP.). Sociedad Internacional de Ciencias Hortícolas(ISHS). Obtenido de https://www.ishs.org/ishs-article/879_32

Kuhar, F., Valeria, C., & Papinutti, L. (2013). doi:https://core.ac.uk/download/pdf/52479411.pdf

Kuhar, F., ValeriaCastiglia, & LeandroPapinutti. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. REVISTA BOLETÍN BIOLÓGICA. doi:https://core.ac.uk/download/pdf/52479411.pdf

Lara, M. A. (2021). Análisis del riesgo de introducción de *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense Raza 4 Tropical (Foc R4T) plaga cuarentenaria para el Ecuador. . Obtenido de https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/7695/1/MUTC-000923.pdf

Leong SK, L. Z. (2009). Caracterización molecular de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense de plátano. Revista Estadounidense de Ciencias Aplicadas 6 (7): 1301-1307. Obtenido de chrome-extension://efhttps://dj.senasica.gob.mx/Contenido/docs/vgtl/foc_r4t/5_Ficha%20T%C3%A9cnica%20FOC%20R4T%20Actualizaci%C3%B3n%20Abril%202021.pdf

Leslie, J., & Summerell, B. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Obtenido de BlackwellPublishing. 1a.Ed.USA.388p.: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2498/1/192101.pdf

LeyvaMir, S. V. (2003). Diferenciacion de aislamiento de *Fusarium* . Revista Fitotecnica Mexicana , 26 (1),37-42.

López-Zapata, & Castaño-Zapata. (2019). . Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. cubense (E.F. SM.) W.C. Snyder & H.N. Hansen]: una revisión. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 22(2):e1240. https://doi.org/10.31910/rudca.v22.n2.2019.1240. Obtenido de http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v22n2/0123-4226-rudca-22-02-e1240.pdf

MAGAP. (2017). Ministerio de agricultura, ganadería, acuacultura y pesca. Obtenido de https://www.agricultura.gob.ec/firman-primer-contrato-para-la-venta-directa-de-bananoorito-entre-productores-y-exportadores/

Martínez, & Soto. (1993). Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de Extracción del adn de fusarium oxysporum f.sp. dianthi.: https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/30030

MCD LAB. (2020). ESPECIALISTA EN MEDIOS DE CULTIVO . Obtenido de file:///C:/Users/xiomy/Downloads/FT%20Agar%20Nutritivo.pdf

NIH. (2023). National Human Genoma Research Institute. Obtenido de FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA (RFLP): https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fragmentos-de-restriccion-de-longitud-polimorfica#:~:text=Definici%C3%B3n,de%20ADN%20en%20lugares%20conocidos.

PLOETZ, R. (2009). Marchitez por *Fusarium:* la enfermedad del banano que se. Actas del Simposio internacional sobre banano ISHS/. Obtenido de file:///C:/Users/xiomy/Downloads/li2013.pdf

Portillo, J. (2020). Fundación ArgenINTA ((Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria)). Obtenido de https://www.fontagro.org/new/uploads/adjuntos/16338_-_Sanidad_Frutales_-_TCdoc.pdf

R. García, L. P.-C.-M.-C.-S. (2003). Evaluación temprana y en condiciones de campo de la resistencia a Mycosphaerella fijiensis Morelet de plantas del cv. Gran enano (AAA) obtenidas a través del cultivo de tejidos y la inducción de mutaciones. Biotecnología Vegetal, 3(2). . Obtenido de https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/225

Ramirez, A. (2022). El test PCR como herramienta de diagnóstico. Obtenido de https://www.3tres3.com/es-mx/articulos/test-pcr-como-herramienta-de-diagnostico-1-2-principios-basicos_14022/

Rodriguez, D. M. (2018). *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense RT4 Croplife Latin America. Obtenido de https://www.croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/el-mayor-enemigo-de-las-musaceas-parece-haber-llegado-al-continente-americano?highlight=WyJob25nbyIsImhvbmdvcyIsImZ1c2FyaXVtIiwib3h5c3BvcnVtIiwib3h5c3BvcnVtZXMiLCJmIiwic3AiLCJjdWJlbnNlIl0=#:~:text=Aun

Rojas, A. C. (2020). conogasi. Obtenido de Método: Gel de electroforesis Agarosa: https://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa/

Schoch CL, e. a. (2020). Taxonomía NCBI: una actualización completa sobre curación, recursos y herramientas. Base de datos (Oxford). 2020: baaa062 . PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187 . Obtenido de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=61366&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock

Tamay de Dios L, I. C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Tecnología en salud. Obtenido de https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf

Tamay de Dios, I. C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.

Thangavelu, R., Gopi, E. E., Pushpakanth, P., Sharmila, K., Prabaharan, M., Loganathan, M., & Uma, S. (2022). National Library of Medicine. Obtenido de Desarrollo de marcadores raciales específicos basados en PCR para la diferenciación del *Fusarium oxysporum* f. indio. sp. cubense , el agente causal de la marchitez por Fusarium en el banano: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8782045/

Tudela, A. M. (2000). Características microscópicas de *Fusarium oxysporum*. Obtenido de https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/fusarium.pdf

Universidad Costa Rica . (2020). Mal de Panamá en Banano (*Fusarium oxysporum* sp. cubense). Obtenido de https://www.ingbiosistemas.ucr.ac.cr/wp-content/uploads/2020/09/BoletinFusarium.pdf

Velarde Félix, S. V. (2018). Identificación molecular de *Fusarium* spp. aislados de maíz en Sinaloa, México. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 9(8), 1675-1689. Obtenido de .https://doi.org/10.29312/remexca.v9i8.756