

Validación de la técnica qPCR con sonda TaqMan para el diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical

Lervin Hernández Ramos¹; Angel Ramírez Suárez¹

¹Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Dirección General de Sanidad Vegetal. Tecámac, Estado de México.

***Autor de**

Correspondencia:

Lervin Hernández Ramos
lervin.hernandez@senasica.gob.mx

Contribución:

Científica

Sección:

Fitosanidad

Recibido:

15 Diciembre, 2023

Aceptado:

15 Enero, 2024

Publicado:

16 Abril, 2024

Cita:

Hernández RL y Ramírez SA. 2024. Validación de la técnica qPCR con sonda TaqMan para el diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical. *Acorbat Revista de Tecnología y Ciencia* 1(1): 39
<https://doi.org/10.62498/AR.TC.2439>

RESUMEN

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical es el agente causal de la marchitez en musáceas. En México es una Plaga Cuarentenada no presente, bajo vigilancia activa. Recientemente, el patógeno se reportó en Colombia, Perú y Venezuela; como respuesta ante estas detecciones, en el CNRF se validó la técnica de qPCR para la detección del gen que codifica una proteína hipotética con sonda TaqMan. Los parámetros evaluados fueron: límite de detección (LOD): 0.00005 ng, sensibilidad 93.75 % de detectar verdaderos positivos. Especificidad 86 % con Cq < 33, 16% sin Cq Cutoff. Repetitividad con un coeficiente de variación 3.18 %. Tasa de falsos positivos 1.56 %. Tasa de falsos negativos 8.33%. Reproducibilidad con un coeficiente de variación 3.07 %.

Palabras clave: FocTR4, qPCR, Validación, Fitosanidad.

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* Race 4 Tropical is the causal agent of wilt in musaceae. In Mexico it is a Quarantined Pest not present, under active surveillance. Recently, the pathogen was reported in Colombia, Peru and Venezuela. In response to these detections, the qPCR technique for gene coding for a hypothetical protein with the TaqMan probe was validated at the CNRF. The parameters evaluated were: limit of detection (LOD): 0.00005 ng, sensitivity 93.75% to detect true positives. Specificity 86% with Cq < 33, 16% without Cq Cutoff. Repeatability with a coefficient of variation 3.18%. False positive rate 1.56%. False negative rate 8.33%. Reproducibility with a coefficient of variation 3.07%.

Keywords: FocTR4, qPCR, Validation, phytosanity.



INTRODUCCIÓN

El plátano, como cultivo, es uno de los frutales más importantes a nivel mundial en términos de producción y comercio; y de manera global se encuentra entre los diez alimentos básicos (Dita *et al.*, 2018). Históricamente, entre las principales limitaciones fitosanitarias en la producción de musáceas se encuentran las enfermedades; de ellas, la marchitez por *Fusarium* (anteriormente conocida como “mal de Panamá”) causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Es considerada la primera enfermedad grave que afectó a los plátanos producidos para el comercio de exportación, causando grandes pérdidas económicas (O'Donnell *et al.*, 1998).

La raza 1 de Foc causó una de las peores epidemias vegetales de la historia y diezmó la industria comercial del plátano Gros Michel en Centroamérica durante la década de los 50's. Como resultado, dicho cultivar fue reemplazado por clones del subgrupo Cavendish resistentes a la raza 1, que ahora son cultivados tanto en la industria de exportación como nacional y de subsistencia, y representan el principal cultivar en superficie y producción a nivel mundial (García *et al.*, 2019).

En 1990 se reportó una nueva variante de Foc que afectó severamente a clones del subgrupo Cavendish en condiciones tropicales y subtropicales en el sureste asiático, al que se le denominó Raza 4 Tropical (R4T), asociada al grupo de compatibilidad vegetativa (VCG) 01213/16 (Mostert *et al.*, 2017). Por más de 20 años, la enfermedad estuvo confinada al sur y sureste de Asia y el norte de Oceanía, sin embargo, reportes recientes han confirmado su presencia en Colombia, Perú y Venezuela.

Debido a que el hongo es considerado como uno de los más destructivos en las musáceas (plátanos y bananos) (Dita *et al.*, 2018), su ingreso y dispersión en áreas donde no se encuentra presente representa un peligro inminente para la industria bananera de América Latina y el Caribe. En México, el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Raza 4 Tropical (Foc R4T) se considera una plaga cuarentenaria ausente. Por tal motivo, para tener métodos de detección y diagnóstico exactos, en el CNRF se validó internamente la técnica de Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) en su modalidad cuantitativa con sonda TaqMan, con los iniciadores y sonda reportados por Aguayo *et al.*, 2017, para la detección y diagnóstico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Se utilizaron seis aislamientos distintos de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (3 de raza 1 y 3 de raza 2) de la colección de hongos fitopatógenos del Laboratorio de Micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), así como otros hongos (*Fusarium solani*, *Colletotrichum musae* y *Alternaria alternata*) y una bacteria (*Ralstonia solanacearum*) que están asociados a Plátano. Para la matriz se utilizaron haces vasculares del cultivar “largo” con síntomas de necrosis interna, proveniente de Jaltocán, Hidalgo y con dictamen positivo a *F. oxysporum* f. sp. cubense raza 1. Así como, dos muestras con dictamen negativo a Foc R1, R2 y R4, una de ellas del grupo Cavendish denominado “enano gigante” proveniente de Tuxtla Chico, Chiapas, y un cultivar “manzano” de Santiago Ixcuintla, Nayarit.

Para la extracción de ADN del tejido vegetal se utilizó el método de extracción CTAB (Doyle y Doyle, 1987), mientras que para los cultivos puros de hongos se utilizó la metodología propuesta por Cenis (1992). Para estimar la concentración de ADN (ng/μL) y determinar la pureza mediante las absorbancias $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c de Thermo Scientific™ de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para verificar que el ADN extraído fue óptimo para ser amplificado y no existían inhibidores de la reacción, se realizó un ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con gen endógeno. Para las extracciones de tejido vegetal se utilizaron los primers CLPL que amplifican una región no codificante del cloroplasto; para las extracciones de cultivos monospóricos se usaron los iniciadores propuestos por Edel *et al.* (1995) que amplifican el espaciador intergénico del ADN ribosomal.

Para los ensayos de qPCR específica se utilizaron los iniciadores y sonda propuestos por Aguayo *et al.*, 2017 basados en la detección del gen que codifica una proteína hipotética (HP) asociada a virulencia de Foc R4T. Los parámetros evaluados fueron límite de detección (LOD), sensibilidad, especificidad (exclusividad), repetibilidad y reproducibilidad. Se consideró como límite de detección a la dilución más baja que generó un valor de C_q y curva sigmoidea completa, en la cual el 80% de las réplicas evaluadas sean detectadas como positivas. Se llevó a cabo la amplificación qPCR con el control positivo en diluciones seriadas con factor de dilución en base 10, quedando [500 ng/rxn], [50 ng/rxn], [5 ng/rxn], [0.5 ng/rxn], [0.05 ng/rxn], [0.005 ng/rxn], [0.0005 ng/rxn] y [0.00005 ng/rxn].

Se realizaron dos tipos de ensayos, el primero utilizando las diluciones del control clonado, mientras, el segundo consistió en las mismas diluciones del control clonado,

pero estas fueron enriquecidas con 50 ng / rxn (equivalente a 2 ng / μ L) de extracción ADN de plátano cv “manzano” para simular la matriz original. Para cada modalidad, se realizaron tres ensayos con tres técnicos, con cuatro replicas por dilución. Se calculó la media, varianza, desviación estándar, coeficiente de variación, regresión lineal de la recta, eficiencia de la reacción y R². Se realizó análisis de varianza ANOVA ($\alpha=0.01$) de un solo factor para determinar si hubo diferencias entre matrices. Para LOD el criterio de aceptación fue la dilución con $\geq 80\%$ de detección de verdaderos positivos.

Ensayo de sensibilidad. Se llevó a cabo la amplificación qPCR con el control positivo en la dilución de [0.00005 ng/rxn]. En una primera serie de ensayos se utilizó únicamente el control clonado de manera pura, en una segunda serie cada muestra fue enriquecida con 50 ng / rxn (equivalente a 2 ng / μ L) de extracción ADN de plátano “manzano” para simular la matriz original. Cada serie consistió de tres ensayos con tres técnicos para cada matriz, incluyendo un total de 60 réplicas de verdaderos positivos. Se determinó el coeficiente de variación y se hizo un análisis de varianza de dos factores (significancia 0.01) para determinar diferencias entre control clonado, matriz y técnicos. Se consideró como muestra positiva aquellas con Cq < 33.

Especificidad. Se llevó a cabo la amplificación qPCR en dos ensayos independientes a las concentraciones de [5 ng / rxn] y [0.005 ng / rxn], incluyendo los distintos organismos, cada ensayo se realizó independiente por tres técnicos, incluyendo cuatro replicas por cada especie, conformando en total 24 repeticiones de verdaderos positivos y 240 réplicas de verdaderos negativos. El porcentaje de especificidad se calculó en dos modalidades, incluyendo el Cq cutoff < 33 e independiente sin incluir un valor Cq limite (cualquier muestra que generó un valor Cq se consideró positiva).

Repetibilidad. Se llevó a cabo la amplificación qPCR en cuatro ensayos independientes por el mismo técnico, bajo condiciones iguales de equipos, reactivos, laboratorio y muestras, en periodos cercanos de tiempo en días. Se incluyó el control positivo, dos controles negativos (Foc R1 y R2), el control de matriz y control de reactivos (NTC), cada uno con cuatro replicas, todo ello en 3 concentraciones [25 ng / rxn], [0.05 ng / rxn], [0.0005 ng / rxn], dando un total de 60 muestras por cada ensayo y un gran total 180 muestras por los tres ensayos. Se realizó un ANOVA ($\alpha=0.01$) para determinar si hubo diferencias significativas de los resultados obtenidos para los controles positivos entre ensayos.

Reproducibilidad. Se llevó a cabo la amplificación qPCR en cinco ensayos independientes realizados por distintos técnicos, bajo condiciones diferentes de equipos, reactivos, laboratorios y en periodos espaciados de tiempo en días o semanas.

Se incluyó el control positivo, dos controles negativos (Foc R1 y R2), el control de matriz y control de reactivos (NTC), cada uno con cuatro replicas, todo ello en 3 concentraciones [25 ng / rxn], [0.05 ng / rxn], [0.0005 ng / rxn], dando un total de 60 muestras por ensayo y un gran total de 300 muestras. Se realizó un ANOVA ($\alpha=0.01$) para determinar si hubo diferencias significativas de los resultados obtenidos para los controles positivos entre ensayos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó como LOD la concentración de 0.00005 ng / rxn (equivalente a 2 fg / μ L, igual a 10294 copias de plásmido por tubo) con un porcentaje de detectar verdaderos positivos en el 83 % de los casos. El LOD determinado aquí es menos sensible al reportado por Aguayo *et al.*, (2017) quienes reportan una sensibilidad de hasta 24 copias de plásmido por reacción con una respuesta positiva del 94 %. La diferencia en los resultados puede ser debida a que en los ensayos no evaluamos las diluciones seriadas siguientes [0.000005 ng / rxn] y [0.0000005 ng / rxn], siendo esta última la que genera un resultado similar de 103 copias por reacción.

En ninguna dilución hubo diferencias significativas entre los ensayos del fragmento clonado y la muestra enriquecida con ADN del hospedante ($p = 0.24$), por lo tanto, existe evidencia de que el genoma del plátano no afecta la eficiencia de amplificación, esto concuerda con lo reportado por Aguayo *et al.*, 2017 quienes no encontraron diferencias al diluir el plásmido en agua o ADN de banano ($p = 0.29$), concluyendo que no hubo una interacción significativa entre la concentración logarítmica del plásmido y la matriz de fondo.

Los valores obtenidos de la pendiente (m) calculada por regresión lineal y que es utilizada como un indicador de la eficiencia de amplificación (E) de la qPCR estuvieron dentro de los intervalos óptimos de eficiencia entre 90 – 110 % (Figura 1) (excepción un ensayo $E = 87.7$), lo que indica que el número de moléculas objetivo se duplicó exactamente en cada ciclo de amplificación. El coeficiente de correlación R^2 fue mayor a 0.99 en cinco de seis ensayos (excepto 0.904), lo que indica que los datos se ajustan bien al modelo empleado.

Respecto a sensibilidad. Se determinó que fue del 93.75% en 120 réplicas de verdaderos positivos evaluados cercanos al LOD 0.00005 ng / rxn. La interacción entre matriz y técnico no fue significativa ($P = 0.18$), mientras que si hubo diferencias entre técnicos ($p = 0.0003$) y entre ambas matrices ($p = 0.0006$), lo que representa que existieron algunas diferencias encontradas en la magnitud de los valores de Cq, dando una ligera pérdida de sensibilidad para el ADN plasmídico diluido en agua, en contraparte, Aguayo et al., 2017 reportan que la ligera pérdida de sensibilidad fue en la matriz del hospedante plátano; sin embargo, para fines prácticos de diagnóstico estas diferencias de Cq no representan un criterio limitante para determinar si una muestra es positiva o negativa.

Considerando el Cq cutoff < 33 calculado en los ensayos de LOD, se determinó un 85.71% de especificidad respecto a los ocho organismos evaluados en ambas concentraciones, incluyendo a los aislamientos distintos de Foc R1 y Foc R2, obtenidos de zonas productoras de plátano en México. En su validación de origen, se evaluaron 136 aislamientos de hongos, incluyendo los 23 VCG's de Foc que constituyen las variantes de raza 1, raza 2 y raza 4 subtropical, de ellos se obtuvo un 93% de especificidad (Aguayo *et al.*, 2017); esta técnica no alcanza el 100 % de especificidad debido a que los autores mencionan que también amplifica para el VCG 0121. De los resultados reportados y obtenidos se concluye que la técnica es específica en detectar y diferenciar a Foc R4T de otros organismos asociados a la matriz. Sin embargo, debido a la evidencia de falsos positivos se sugiere que muestra detectada como positiva por qPCR sea corroborada con otra técnica molecular.

Para repetibilidad, debido a que el análisis es cuantitativo se utilizó el coeficiente de variación como medida de precisión. En relación a los controles positivos la concentración de [25 ng] tuvo un CV = 4.44 %, para [0.05 ng] un CV = 2.43 % y para [0.005 ng] un CV = 3.22 %, mientras que, Aguayo *et al.*, (2017) reportan un CV máximo de 0.93 %, en ambos casos, se concluye que los datos fueron homogéneos, ya que no exceden el 35 % máximo permitido (U.S. FDA, 2020) indicando una alta repetibilidad de los ensayos. Los valores predictivos tanto positivos como negativos fueron mayores a 90 %, por lo tanto, una detección positiva de Foc R4T es robusta para confirmar su presencia, el ensayo detecta correctamente al 93% de las muestras evaluadas. Del mismo modo, un resultado negativo es preciso en determinar que una planta sospechosa no está infectada con Foc TR4, ya que el ensayo identifica correctamente al 97 % de las muestras que no tienen Foc TR4.

Respecto a reproducibilidad, en relación a los controles positivos la concentración de [25 ng] tuvo un CV = 6.49 %, para [0.05 ng] un CV = 1.57 % y para [0.005 ng] un CV = 1.99 %, mientras que, Aguayo et al., (2017) reportan un CV

máximo de 1.71 %, en ambos casos, se concluye que los datos fueron homogéneos, ya que no exceden el 35 % máximo permitido (U.S. FDA, 2020) indicando una alta reproducibilidad de los ensayos. El ANOVA mostró diferencias significativas ($p = 0.00009$), no hubo una tendencia clara sobre que variable influyó más en incidir sobre la magnitud de los valores de Cq. La tasa de falsos positivos y falsos negativos no excedió el 5%, por lo que está dentro del valor permitido (NATA, 2013).

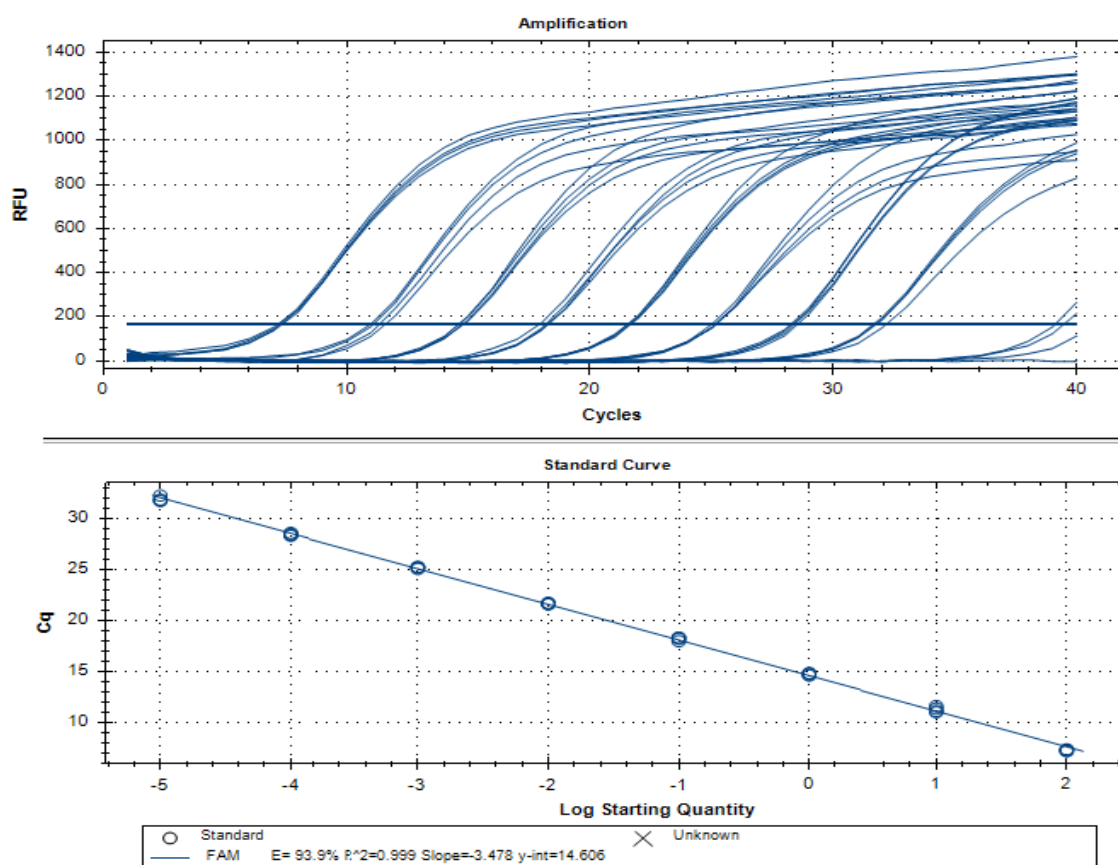


Figura 1. Ensayo de límite de detección (LOD) en diluciones seriadas con factor de dilución en base 10, para el técnico 2 con control clonado + matriz de fondo H₂O.

CONCLUSIONES

La detección de Foc R4T involucra tener herramientas de diagnóstico exactas y precisas, para ello, se validó internamente los iniciadores y sonda de qPCR diseñados por Aguayo *et al.*, 2017, se demostró que la técnica es apta para detectar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 tropical a partir del hospedante plátano. Los resultados

de los parámetros evaluados: límite de detección, sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad cumplen satisfactoriamente. El parámetro especificidad no fue 100 % satisfactorio para identificar a Foc R4T, por lo tanto, un dictamen positivo únicamente por esta técnica no será válido, y deberá corroborarse el resultado por otras herramientas moleculares o secuenciación.

REFERENCIAS

1. Aguayo J, Mostert D, Fourrier JC, Cerf WI, Hostachy B, Viljoen A, Ioos R. 2017. Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. PLoS ONE 12: e0171767.
2. Ceniz LJ. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Research 20: 2380.
3. Dita RMA, Barquero M, Heck D, Mizubuti ESG, Staver CP. 2018. Fusarium Wilt of Banana: Current knowledge on epidemiology and research needs toward sustainable disease management. Frontiers in Plant Science 9:1468.
4. Doyle JJ, Doyle LJ. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
5. Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C. 1995. Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. Phytopathology 85: 579-585.
6. García BFA, van der Veen AJT, Nakasato TG, Meijer HJG, Arango IRE, Kema GHJ. 2019. An improved phenotyping protocol for Panama disease in banana. Frontiers in Plant Science 10:1006.
7. Mostert D, Molina AB, Daniells J, Fourie G, Hermanto C, Chao CP, Fabregar E, Sinohin GV, Masdek N, Thangavelu R, Li C, Yi G, Mostert L, Viljoen A. 2017. The distribution and host range of the banana Fusarium wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, in Asia. PLoS ONE 12: e0181630
8. NATA, (2013). Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Technical Note 17. National Association of Testing Authorities 32p.
9. O'Donnell K, Kistler C, Cigelnik E, Ploetz CR. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95: 2044-2049.
10. United State Food and Drug Administration FDA. (2020). Guidelines for the validation of analytical methods for nucleic acid sequence-based analysis of food, feed, cosmetics and veterinary products. FDA. 1st Edition.