

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Análisis de prevalencia y variabilidad genética del virus del estriado del banano
(BSV) en Ecuador

VIDA-463

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Nombre de la titulación

Biólogo

Presentado por:

Angie Gabriela Fajardo Calderón

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico, en primer lugar, a Dios, quien ha orientado mi camino en todo momento, brindándome sabiduría, afirmación y fortaleza, incluso cuando yo no logro ver de lo que soy capaz.

A toda mi familia, pilar de bendición en mi vida, que siempre ha estado para mí.

De manera especial a mis padres, Henry Fajardo y Tamara Calderón; a mi hermano Sebastián y a mi novio Obed Rodríguez. Gracias por su apoyo incondicional, sus consejos constantes y por escucharme en todo momento.

A mis abuelitos y tía Verónica Bajaña, quienes siempre estuvieron pendientes de mí con un cariño infinito.

Gracias a todos por impulsarme a seguir, por preocuparse y demostrarme un amor incondicional en cada etapa de este camino. Atesoro lo que Dios ha hecho en mi vida gracias a las personas que ha puesto en mi camino.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor, el PhD. Diego Quito-Avila, por la oportunidad brindada, por su valiosa guía académica y por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo.

A Raúl Cifuentes, Milenka Vera y a todos los miembros del laboratorio de virología. Por todas las enseñanzas compartidas, su paciencia y el apoyo constante durante mi curva de aprendizaje. Gracias por hacer del laboratorio un espacio de crecimiento.

A AGROCALIDAD, cuyo apoyo fue fundamental para el desarrollo de esta investigación.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) y sus profesores, por recibirme y brindarme oportunidades invaluable de formación, permitiéndome estudiar rodeada de un entorno natural maravilloso que siempre recordaré.

Finalmente, a todos los compañeros y amigos que conocí a lo largo de esta travesía, con quienes nos apoyamos para crecer juntos.

Declaración Expresa

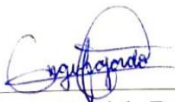
Yo Angie Gabriela Fajardo Calderón, acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 12 de octubre del 2025.



Angie Gabriela Fajardo
Calderón

Evaluadores

Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor de Materia

Diego Fernando Quito Ávila

Tutor de proyecto

Resumen

La producción bananera de Ecuador enfrenta desafíos fitosanitarios significativos, siendo el Banana streak virus (BSV), género *Badnavirus*, una amenaza latente. Este proyecto evalúa la incidencia y diversidad genética del patógeno en las provincias de Guayas y Los Ríos para fortalecer el diagnóstico local. Durante el desarrollo se recolectaron tejidos foliares y reproductivos mediante un muestreo dirigido primordialmente a plantas con sintomatología característica. Se optimizaron protocolos de extracción de ácidos nucleicos y se ejecutaron ensayos de PCR de punto final dirigidos a regiones de la cápside y poliproteínas, complementados con secuenciación Sanger y análisis filogenético. Los resultados demostraron la presencia del virus en localidades del Guayas como San Lorenzo de Garaicoa, Tenguel y Salitre. Se identificó al Banana Streak OL virus (BSOLV) mediante alineamientos que revelaron alta homología con secuencias de referencia. Asimismo, se validó la amplificación viral en cáscara de fruto, confirmando la naturaleza sistémica de la infección. Se concluye que BSOLV prevalece en el Ecuador y que la herramienta molecular estandarizada garantiza una detección robusta, fundamental para el monitoreo de la salud del cultivo y la prevención de la dispersión viral.

Palabras Clave: Badnavirus, Diagnóstico molecular, *Musa spp.*, PCR, Filogenia.

Abstract

Banana production in Ecuador confronts significant phytosanitary challenges, with Banana streak virus (BSV), genus Badnavirus, representing a latent threat. This project assessed the incidence and genetic diversity of the pathogen across Guayas and Los Ríos provinces to strengthen local diagnostic capabilities. Throughout the study, foliar and reproductive tissues were collected via targeted sampling, prioritizing plants exhibiting characteristic symptomatology. Nucleic acid extraction protocols were optimized, and endpoint PCR assays targeting capsid and polyprotein regions were performed, followed by Sanger sequencing and phylogenetic analysis. Findings confirmed viral presence in Guayas localities such as Tenguel and Salitre, specifically identifying Banana streak OL virus (BSOLV) through alignments, demonstrating high homology with reference sequences. Furthermore, viral amplification was validated in fruit peel tissue, corroborating the systemic nature of the virus. It is concluded that BSOLV is prevalent in Ecuador, and the standardized molecular tool ensures robust detection, which is critical for crop health monitoring and the prevention of viral dissemination.

Keywords: Badnavirus, Molecular diagnosis, Musa spp., PCR, Phylogeny.

Índice general

Evaluadores	IV
Resumen	I
<i>Abstract</i>	II
Índice general	III
Abreviaturas	VI
Simbología	VIII
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	X
Capítulo 1	1
1.2 Descripción del Problema	4
1.3 Justificación del Problema	6
1.4 Objetivos.	7
<i>1.4.1 Objetivo general</i>	7
<i>1.4.2 Objetivos específicos</i>	7
1.5 Marco teórico	8
1.5.1 Cultivo de Banano	8
1.5.2 <i>Banana Streak Virus (BSV)</i>	9
1.5.2.1 Panorama General y Morfología	9
1.5.2.2 Distribución geográfica del BSV y hospederos	9
1.5.2.3 Genoma y variabilidad genética	10
1.5.2.4 Transmisión, Sintomatología y Manejo	11
1.5.2.5 Detección	11
1.5.3 Técnicas moleculares preanalíticas (Procesamiento de material genético): Extracción de Ácidos Nucleicos Totales	12
1.5.4 Técnicas analíticas específicas (Diagnósticas): RT, PCR y Secuenciación de ADN	12
1.5.4.1 PCR	12

1.5.4.2 RT-PCR.....	13
1.5.4.3 Secuenciación de ADN	14
Capítulo 2	15
2. Metodología.	16
2.1 Colección de muestras de banano	16
2.2 Procesamiento preanalítico: Extracción de ácidos nucleicos	19
2.3 Detección viral: RT, PCR, Electroforesis, Purificación y Secuenciación Sanger.....	21
2.3.1 RT.....	21
2.3.2 PCR	22
2.3.3. Electroforesis.....	24
2.3.4 Purificación de amplicones y Secuenciación Sanger	25
2.4 Análisis Bioinformático	25
Capítulo 3	27
3. Resultados y análisis	28
3.1 Estandarización y optimización del protocolo de detección molecular.	28
3.1.1. Adaptación de la extracción de ácidos nucleicos	28
3.1.2. Optimización de la amplificación y evaluación del tipo de molde	30
3.1.2.1 Validación del tipo de template: PCR Directa vs RT-PCR.....	31
3.1.2.2 Evaluación del desempeño y calidad de los sistemas enzimáticos.	32
3.1.2.3 Especificidad de cebadores	33
3.2 Detección viral y prevalencia en zonas de estudio, tejidos y correlación sintomatológica.....	34
3.2.1 Detección viral y prevalencia.	34
3.2.2 Evaluación de tejidos y correlación sintomatológica	37
3.3 Identidad taxonómica.	38
3.4 Análisis filogenético y distancia genética.	39
Capítulo 4	42
4.1 Conclusiones y recomendaciones.....	43

<i>4.1.1 Conclusiones</i>	43
<i>4.1.2 Recomendaciones</i>	44
Referencias	45

Abreviaturas

ADN / DNA Ácido Desoxirribonucleico

ADNc / cDNA ADN complementario

ARN / RNA Ácido Ribonucleico

BBrMB Virus del Mosaico de la Bráctea

BLASTn *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*

BMV *Banana Mosaic Virus* (Virus del Mosaico del Banano)

BSV *Banana Streak Virus* (Virus del Estriado del Banano)

BSOLV *Banana Streak OL Virus*

BBTV *Banana Bunchy Top Virus*

dNTPs Desoxirribonucleótidos trifosfato

dTT Ditiotreititol

EDTA Ácido Etilendiaminotetraacético

ELISA Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESPOL Escuela Superior Politécnica del Litoral

FOB *Free on Board*

HTS *High-Throughput Sequencing* (Secuenciación de Alto Rendimiento)

INIAP Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

MEGA *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

M-MLV *Moloney Murine Leukemia Virus* (Transcriptasa Inversa)

MPCEIP Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca

NCBI *National Center for Biotechnology Information*

ORF *Open Reading Frame* (Marco de Lectura Abierto)

PCR *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

RT-PCR *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (PCR con transcriptasa Inversa)

SIPA Sistema de Información Pública Agropecuaria

TAE Tris-Acetato-EDTA

Simbología

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
g	Gramo
h	Horas
ha	Hectárea
kb	Kilobase
kg	Kilogramo
m	Metro
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
pb / bp	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
t	Tonelada
uM / μ M	Micromolar
U/ μ l	Unidades por microlitro
μ l	Microlitro
V	Voltio

Índice de figuras

Figura 1 Mapa de las provincias muestreadas del Ecuador	16
Figura 2 Sintomatología de plantas muestreadas para diagnóstico molecular del Banana streak virus	17
Figura 3 Muestras seleccionadas para elaboración de protocolo de diagnóstico molecular	18
Figura 4 Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas consenso de aislados ecuatorianos de Banana streak virus (BSV).....	26
Figura 5 Evaluación de la integridad y calidad de ácidos nucleicos totales extraídos de fruto y hoja de Musa spp.....	30
Figura 6 Ensayo final de perfil electroforético en gel de agarosa confirmando la detección de BSV en tejidos foliares y reproductivos	31
Figura 7 Evaluación comparativa de eficiencia de amplificación de cuatro sistemas de enzimas de ADN polimerasa para el diagnóstico molecular de BSV	33
Figura 8 Resultados electroforéticos de análisis de muestras sospechosas de infección activa .	35
Figura 9 Ubicación espacial de los casos positivos de Banana streak virus en zonas de estudio	36
Figura 10 Verificación electroforética de la calidad y pureza de los amplicones previo a su envío para secuenciación Sanger	38
Figura 11 Análisis filogenético de aislados de Banana streak virus basado en la secuencia parcial del gen de la cápside (set BSV 156 / 962) y la región de poliproteína (set BSV 4673 / 5317), pertenecientes al ORF3	40
Figura 12 Matriz de porcentaje de identidad nucleotídica por pares (Pairwise distance) entre los aislados ecuatorianos.....	41

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Provincia, localidad, sitio de muestreo, tipo y número de muestras obtenidas y analizadas.....</i>	18
Tabla 2 <i>Composición de la mezcla de reacción para PCR de punto final de mezclas maestras (MasterMix).....</i>	23
Tabla 3 <i>Componentes y cantidades usadas para las reacciones de PCR con enzima Green Script</i>	23
Tabla 4 <i>Parámetros espectrofotométricos de muestras de tejido vegetal (Musa spp.) con diagnóstico positivo: concentración y relaciones de absorbancia</i>	29
Tabla 5 <i>Localidades analizadas y su diagnóstico.</i>	35

Capítulo 1

1.1 Introducción

El banano (*Musa spp.*) encabeza como uno de los cultivares pertenecientes al sistema agrícola tropical más importante, debido a su amplia producción, acogida social y el papel fundamental que cumple en la economía exportadora de diferentes países. Según Murillo (2021), los principales productores son las naciones de “África, Brasil, China, entre los que destacan Colombia, Costa Rica y Ecuador”.

La familia Musaceae comprende un grupo reducido de plantas herbáceas perennes de gran tamaño. El género *Musa* engloba a las especies cultivadas de banano, cuyos frutos se caracterizan por su dulce sabor y alto valor nutricional (Pareek, 2016), ampliamente aceptados para consumo humano (Qamar & Shaikh, 2018). A pesar de que cada planta produce una única inflorescencia por ciclo vegetativo, cada racimo puede desarrollar de 8 a 20 manos y aproximadamente de 70 a cientos de dedos en condiciones óptimas (Kumar et al., 2021). Este rendimiento, junto con la calidad, y riqueza nutricional de su fruto lo destaca entre los productos de mayor exportación a nivel global.

En Ecuador, la industria bananera es uno de los sectores más resilientes y estratégicos, manteniendo su liderazgo internacionalmente como uno de los principales exportadores de banano. De acuerdo con el boletín de cifras del Ecuador presentado en septiembre del 2025 por el MPCEIP, el banano, después del camarón y el petróleo, es el producto que más se exporta en el país con ingresos de USD 2.428 millones FOB registrados entre enero y julio del 2025 (Muñoz & Vargas, 2025). Asimismo, las exportaciones acumuladas registraron un volumen de cosecha de 257,44 millones de cajas de aproximadamente 18,14 kg cada una, destacando como principales destinos Unión Europea, Estados Unidos, China, Rusia y Países Bajos (BananaExportNw, 2025).

Actualmente, la producción bananera nacional enfrenta grandes desafíos que afectan integralmente en la calidad del fruto y, en consecuencia, el rendimiento de la exportación. Entre

los principales problemas que limitan la productividad bananera reportados se encuentran las condiciones climáticas, incidencia de fenómenos naturales, y la susceptibilidad del cultivo a enfermedades fitosanitarias, agravadas por la carencia de inversión (Salazar, 2025). Este último destaca como una de las amenazas estructurales más severas y persistentes, que generan una gran pérdida económica, dado que puede ocasionar reducciones en la productividad y calidad del fruto de hasta un 80%, incrementa costos de manejo y dificulta la recuperación de las unidades productivas afectadas (Ewané et al., 2024).

Manzo (2014) establece que las principales enfermedades virales de mayor relevancia cuarentenaria y económica son las pertenecientes al “*Banana bunchy top virus* (BBTV), virus del mosaico de la bráctea (BBrMV), virus del estriado del banano (BSV) y virus del mosaico del plátano (BMV)”. Solórzano, 9 años más tarde, reafirma a Manzo colocando al BSV como uno de los patógenos que más afectan a la familia de las musáceas y por consiguiente como un gran desafío para los productores (Martinez-Solórzano et al., 2023).

Los BSVs pertenecen al género *Badnavirus*, familia *Caulimoviridae*. Son partículas virales baciformes sin envoltura que contienen ADN circular bicatenario parcialmente cerrado. La infección por estos virus se asocia con presentar rayas amarillas o blanquecinas, que progresan hacia la necrosis en las hojas, fisuras y deformaciones en los frutos, así como una disminución del crecimiento vegetativo y tamaño del racimo, impactando significativamente las unidades de producción (Bhardwaj et al., 2025).

En Ecuador, la información sobre prevalencia y diversidad genética de los BSVs sigue siendo escasa, limitando la comprensión epidemiológica. Además, el fortalecimiento de la exportación y el intercambio puede incrementar el riesgo de introducción de variantes virales (Diario, La Hora, 2006). Ambas situaciones representan una amenaza preocupante para la economía ecuatoriana. El presente trabajo se orienta a generar conocimiento técnico sobre la prevalencia y variabilidad genética de los BSVs en Ecuador, integrando competencias de

diagnóstico molecular (PCR), bioinformática y análisis filogenético. Se observarán cuatro capítulos. El primero, sitúa el contexto, objetivos, descripción del problema y la justificación de este; el segundo detallará la metodología empleada; el tercero expondrá los resultados y análisis para finalmente, en el cuarto, presentar las conclusiones y recomendaciones pertinentes a la aplicación de los hallazgos realizados.

1.2 Descripción del Problema

La exportación de banano es el tercer ingreso más fuerte a nivel nacional, siendo un cultivo de gran importancia económica y social para el Ecuador (Murillo et al., 2021).

Los cultivos de banano enfrentan diferentes desafíos entre los que se destaca la problemática fitosanitaria al ser propensos a infecciones (Bhardwaj et al., 2025). Cada año a nivel mundial, un 40% de cultivares son afectados y aproximadamente el 47% de los patógenos responsables son virus (Martinez-Solórzano et al., 2023).

Los Virus del Estriado de Banano (BSVs) son pararetrovirus. Para replicarse no necesitan ingresar al genoma de su huésped, sin embargo, en caso de hacerlo, podrían activarse para generar enfermedades (Jaufeerally-Fakim et al., 2006). Se han identificado 12 especies que pueden estar presentes tanto de forma episomal o endógena (Bhardwaj et al., 2025). Son de comportamiento sistémico y pueden transmitirse a través de vectores, o mediante herencia del material genético viral, garantizando la transmisión al 100% de su progenie (Bhardwaj et al., 2025). Estas características asocian a la enfermedad con pérdidas de un 7% hasta un 90% de la producción, que afectan a millones de plantas y productores (Mocha-Cuenca, 2020).

En Ecuador, se han generado afectaciones severas en los cultivares de *Musa spp.* vinculados al BSV. El virus induce síntomas en el pseudotallo, hoja y fruto, que varían desde el moteado, líneas de coloración blanca o amarillentas en el margen de la hoja, grietas y moteado en la cáscara del fruto hasta la necrosis en la hoja y deformación de frutos. Estas alteraciones reducen la capacidad fotosintética de la hoja, el tamaño y peso del racimo, y retrasan el

crecimiento de la planta. En infecciones severas, obliga a los productores a eliminar miles de unidades de producción, alzando los costos de producción para implementar insumos que estabilicen los cultivos y controlen a los vectores (Armijos et al., 2004). En conjunto, estos factores comprometen significativamente la calidad y rendimiento de los cultivos, limitando su valor comercial y su competitividad en los mercados internacionales (Bhardwaj et al., 2025).

Es necesaria la implementación de estudios que muestren la presencia temprana de estos virus, analizando la variabilidad genética de los BSVs sobre los cultivares ecuatorianos, de manera que permita optimizar programas de vigilancia epidemiológica y generar estrategias de contención, prevención y manejo del virus a favor de los productores ecuatorianos.

1.3 Justificación del Problema

La industria bananera ecuatoriana presenta un sólido crecimiento de exportación a nivel mundial, posicionando al Ecuador como una de las naciones más destacadas en la exportación de banano (López, 2025). En 2024, se ubicó al banano como el segundo producto no petrolero tradicional de mayor importancia económica de la nación al recaudar USD 3.882,01 millones (Ortiz, 2025). Siendo un motor para emplear y generar ingresos a familias ecuatorianas, además de posicionar mundialmente al país como un mercado competitivo.

La presencia del BSV en cultivos de banano amenaza la sostenibilidad de la producción ya que, en sus diferentes variantes genómicas es responsable de severas patologías que afectan la productividad, calidad y rendimiento, reduciendo la capacidad productiva hasta en un 90% (Mocha-Cuenca, 2020) .

Su diversidad genética es elevada, diferenciándose en 12 especies con dos diferentes formas de integración al genoma del hospedero y activación de su infección, lo que dificulta la aplicación de técnicas moleculares de detección sensibles y específicas (Umber et al., 2022).

En el caso de Ecuador, la información disponible sobre los BSV es escasa, dificultando su diagnóstico, conocimiento epidemiológico, evaluación de riesgo fitosanitario y formulación de respuestas oportunas para un manejo eficaz, lo que limita la comercialización del banano (Mocha-Cuenca, 2020). Esta carencia de datos representa una brecha fundamental para poder establecer programas de detección, monitoreo y control, los cuales estén intrínsecamente relacionados con el contexto nacional. El presente estudio es indispensable porque permitirá sentar bases técnicas de la presencia del BSV en Ecuador, facilitando y optimizando la implementación de estrategias que reduzcan las pérdidas en el rendimiento y fortalezcan la seguridad de los productores junto con la competitividad del mercado bananero.

1.4 Objetivos.

1.4.1 Objetivo general

Analizar la prevalencia y variabilidad genética del Virus del Estriado del Banano (BSV) en plantaciones comerciales del Ecuador y mercados pertenecientes a la ciudad de Guayaquil, mediante técnicas moleculares y bioinformáticas, para su uso en la implementación en medidas de manejo.

1.4.2 Objetivos específicos

- a) Desarrollar un protocolo de detección de BSV a partir de la hoja y corteza de banano tierno mediante métodos moleculares.
- b) Determinar la prevalencia de BSV en Ecuador a través de análisis moleculares en muestras provenientes de Fincas y mercados.
- c) Analizar la variabilidad genética de aislados ecuatorianos de BSV mediante secuenciación y análisis filogenético de fragmentos genómicos del virus.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Cultivo de Banano

La familia Musaceae engloba a tres géneros de plantas herbáceas perennes de gran tamaño *Musa*, *Ensete* y *Musella*. El primero, es aquel del que surgen los cultivares de bananos que destacan por su amplio consumo a nivel mundial (Lau et al., 2020).

La planta de banano puede alcanzar hasta 7,5 m de altura con un sistema radicular formado por raíces primarias que alcanza los 3 metros de longitud y secundarias focalizadas en los primeros 60 cm del suelo, las cuales surgen del rizoma. Su estructura se basa en un pseudotallo formado por un conjunto de vainas foliares que se encuentran sujetas en espiral y un tallo diferenciado en 3 secciones: rizoma, tallo aéreo y pedúnculo. El rizoma es crucial para la producción de nuevas plantas prósperas, y es de donde surgen las flores que posteriormente subirán y se convertirán en frutos, recordando que su reproducción es completamente asexual (Banabiosa, 2022). Se produce una sola inflorescencia por ciclo vegetativo en su centro, sostenida por el pedúnculo. Su fruto, es una baya sin semilla cuya maduración consiste en un transcurso de 80 a 120 días. Estos vienen agrupados en racimos, los cuales se componen de varias “manos”, y están formadas por hileras de frutos individuales denominados “dedos” (Monique & Simmonds, 2016).

El clima ideal para el cultivo es el tropical húmedo con temperaturas de 18.5°C hasta 35.5°C, precipitaciones mínimas mensuales de 120 mm, luminosidad óptima de aproximadamente 1000 horas luz anuales, vientos suaves y altitudes entre 0 a 300 metros. En Ecuador, el banano (*Musa paradisiaca* AAA) se encuentra distribuido en todo el litoral ecuatoriano abarcando provincias como Esmeraldas, Pichincha, Guayas, los Ríos, El Oro y Santa Elena (Jaramillo, 2020). En 2024 se reporta una superficie cosechada de 175,818 hectáreas con una producción y rendimiento de 7,558,208 t y 42,99 t/ha respectivamente (SIPA, 2024).

1.5.2 *Banana Streak Virus (BSV)*

1.5.2.1 Panorama General y Morfología

Los BSVs (virus del estriado de banano) son un complejo de especies virales que forman parte del género *Badnavirus* en la familia *Caulimoviridae* y se caracterizan por tener partículas virales baciformes. Se los conoce de manera informal como pararetrovirus vegetales, ya que, a pesar de tener un genoma de ADN, tiene un paso de retro-transcripción a lo largo de su replicación. Esta familia está constituida por 8 géneros con dos diferentes morfologías, isométricas y baciformes. No poseen envoltura y cuentan con un tamaño estimado de 30 nm de diámetro y una longitud entre 120 y 150 nm (Bhat et al., 2016).

1.5.2.2 Distribución geográfica del BSV y hospederos

Los *Badnavirus* se encuentran distribuidos geográficamente en regiones tropicales y templadas. La mayoría de las especies de este género infectan cultivos tropicales y subtropicales perennes (Sharma et al., 2014). Entre estos, el plátano, la pimienta negra, cítricos, cacao, caña de azúcar, taro y ñame (Bhat et al., 2016).

Los BSVs fueron descubiertos por primera vez en Marruecos en 1974, desde ese momento, han sido reportados en diferentes países de África, Sudamérica, El Pacífico y Asia, entre ellos, el Ecuador (Bhat et al., 2016). Una característica de los pararetrovirus es que pueden integrar su genoma al de su hospedero, a pesar de no requerirlo durante su replicación. Es decir, los eventos de integración ocurren de forma aleatoria y accidental para el virus. A estas formas integradas se las conoce como pararetrovirus endógenos (*endogenous pararetrovirus*, EPRV)

Es así como, además de banano, se han encontrado secuencias pararetrovirales similares al BSV en el genoma nuclear de otras plantas como la petunia, el tabaco, la papa, el arroz y tomate. Esto no quiere decir que sean huéspedes. Sin embargo, la presencia de EPRV en el genoma de estas plantas complica el diagnóstico molecular por PCR convencional, y si son

capaces, podrían expresar genomas virales que se desarrollen en partículas virales (Le Provost et al., 2006).

1.5.2.3 Genoma y variabilidad genética

Este complejo de virus tiene un genoma circular de doble cadena cerrado, no covalente, con un tamaño aproximado de 6,9 kb a 7,8 kb. Este consiste en una molécula de ADN de dos hebras, la cual incluye al menos tres marcos de lectura abiertos característicos de los *Badnavirus*. En el ORF I se traduce una poliproteína de 23 kD asociado al virión, el ORF II es de 312 pb a 561 pb relacionado con una proteína de unión de ácidos nucleicos y el tercer ORF traduce a una poliproteína de 216 kDa que contiene la transcriptasa inversa y la RNasaH (Jaufeerally-Fakim et al., 2006).

Se replican a través de un ARN intermediario como hacen los retrovirus a través de la enzima transcriptasa inversa que codifican, sin que la integración al genoma sea necesaria, acumulándose en forma de mini cromosomas en el núcleo del huésped (Bhat et al., 2016). Sin embargo, se ha observado la integración del genoma de estos virus, incluidos BSV, en el genoma de la planta huésped, especialmente en plantas de banano, arroz y tomate (Le Provost et al., 2006). Por lo que las especies infectivas pueden encontrarse de dos formas: el genoma está presente como el ADN circular y endógena donde el genoma se integra con el huésped (Bhardwaj et al., 2025). Esta integración puede ser completa o incompleta, así como capaces e incapaces de formar infecciones virales episómicas (Bhat et al., 2016). En los BSVs se han diferenciado dos tipos de integrantes. Uno que posee el genoma completo intercalado con secuencias invertidas no contiguas, con la capacidad de recombinarse y activar el proceso de escisión que produce la forma episomal del virus; y otro con el genoma incompleto que no le permiten ser infeccioso (Le Provost et al., 2006).

Existen varias especies reportadas de BSV con diferencias serológicas y genómicas. Higginson (2007) establece que Uganda reportó en diferentes variedades de *Musa spp.*, hasta 12

nuevos tipos de BSV, ejerciendo infecciones tanto individuales como mixtas. No se ha logrado establecer la razón de la variabilidad genética del BSV.

1.5.2.4 Transmisión, Sintomatología y Manejo

Los *Badnavirus* pueden transmitirse de dos formas. Verticalmente, a través de material de siembra infectado, hereditariamente. Y horizontalmente, basado en la infección de plantas sanas a través de vectores como las cochinillas (Bhat et al., 2016).

Los BSVs, atacan a la familia de las Musáceas. Por ello, las plantas de banano son susceptibles en cualquier etapa de su desarrollo. La infección es sistémica, lo que facilita su propagación y afecta completamente a la unidad de producción (Armijos et al., 2004). Los síntomas van a variar acorde a la especie viral, cultivar y condiciones ambientales (Bhat et al., 2016). En el género *Musa spp.*, los síntomas son marcados en la morfología de la planta y fruto, presentándose a medida que la enfermedad avanza. En la hoja, del lado del envés, se observan rayas amarillas o cloróticas en patrones, estrías, las cuales, se vuelven necróticas; además, ocurre división y debilitamiento en el pseudotallo junto una pudrición acuosa basal; finalmente, se generan grietas y moteado en la cáscara del fruto. Las afectaciones se visualizan de manera más agresiva a 22°C y disminuye en temperaturas entre 28°C y 35°C (Bhardwaj et al., 2025).

No hay productos disponibles en Ecuador para el control de virus en plantaciones. Por ello, durante un estudio realizado por el INIAP se realizaron 3 recomendaciones para el manejo del BSV en cultivos. El primero se enfoca en el uso de material vegetal libre del virus, el segundo indica la eliminación de plantas enfermas, por lo que resulta en la pérdida de esa unidad, y por último, controlar la población de vectores (Armijos et al., 2004).

1.5.2.5 Detección

Se pueden aplicar diferentes métodos para el diagnóstico que pueden ser visuales como serológicos. Los visuales se basan en la inspección de la morfología de la planta y la detección

de partículas virales por medio de microscopía electrónica. Los serológicos se basan en ELISA, hibridación por *dot-blot* y PCR.

La técnica más usada en diversos estudios para la identificación de este virus se basa en la aplicación de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Sin embargo, es complejo diferenciar el ADN independiente y replicativo de las secuencias integradas al huésped, por lo que complementan con técnicas inmunológicas (Higginson, 2007).

1.5.3 Técnicas moleculares preanalíticas (Procesamiento de material genético): Extracción de Ácidos Nucleicos Totales

Este es un paso preanalítico crucial para poder aplicar métodos de pruebas moleculares de diagnóstico exitosas. Por ello se realiza con cuidado la recolección y preparación de muestra, su transporte y almacenamiento, la estabilización de ácidos nucleicos para finalmente extraerlos (Shin, 2018).

Esta técnica de extracción consta de tres procesos: Aislamiento o lisis celular, purificación e inactivación de nucleasas intracelulares y concentración. Y lo que se realice en cada uno de ellos va a depender de las características de la muestra, su sensibilidad y lo que se desee analizar (Orfao & Pinto, 2011).

1.5.4 Técnicas analíticas específicas (Diagnósticas): RT, PCR y Secuenciación de ADN

1.5.4.1 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica molecular que permite la amplificación de un grupo de ácidos nucleicos de interés, a través del uso de una enzima denominada Taq polimerasa. Esta es una ADN polimerasa termoestable obtenida de *Thermus aquaticus*. Además, se hace uso de cebadores, secuencias de 20 a 30 nucleótidos complementarios a regiones específicas guía. Consta de 3 fases principales que se ciclan, y estos

consisten en la: desnaturalización, la unión de los cebadores y la amplificación. (Khehra et al., 2025).

En la desnaturalización el ADN o ADNc es expuesto a 95°C para que los puentes de hidrógeno presentes se rompan y las hebras se separen. Luego, baja la temperatura a la ideal de los cebadores, habitualmente entre 55°C a 72°C, permitiendo que estos reconozcan la secuencia complementaria en cada hebra y se unan a ella. Finalmente, se da una fase de extensión, donde la enzima polimerasa reconoce al cebador y se une para empezar a añadir nucleótidos complementarios, recorriendo la cadena en dirección 5' a 3'. Este proceso se repite en un termociclador de 30 a 40 veces generando múltiples copias de ADNc. Se toma en cuenta que la eficiencia de la amplificación disminuye con el aumento de los ciclos (Khehra et al., 2025).

Existen dos tipos de PCR, aquella de tiempo real y la de punto final. La primera, es de carácter cuantitativo, detectando durante la amplificación y cuantificando por medio de *probes* específicos y tintes que se encarguen de la emisión de señales. Y la segunda es cualitativa, solo indica la presencia o ausencia de la secuencia y se revela por medio de un proceso adicional de electroforesis (Khehra et al., 2025).

1.5.4.2 RT-PCR

Es una técnica molecular que se enfoca en la generación de una hebra de ADN que provenga de ARN complementaria a esta. La aplicación se realiza por medio de una enzima conocida como Retro transcriptasa característica de mecanismos retrovirales, la cual se encarga de transformar el ARN en ADNc, permitiendo que pueda ser amplificada en PCR (Martin, 2019).

En los virus, esta enzima se encarga de tres procesos acorde a Katharine Martin (2019), “Activar la ADN polimerasa dependiente de ARN, activar la ribonucleasa H y activar la ADN polimerasas dependiente de ADN”. Este concepto se aplicó en biología molecular permitiendo

no solo usar muestras de ADN sino también de ARN para detecciones, análisis de genética de tumores, expresión de proteínas, entre otras (Martin, 2019).

1.5.4.3 Secuenciación de ADN

La secuenciación es un proceso mediante el cual se determina el orden exacto de los nucleótidos en un fragmento de ADN o genoma completo (*Khan Academy*, s. f.).

Una de las principales razones del surgimiento de estas tecnologías tiene que ver con el estudio viral a través de la secuenciación y el ensamble de genomas que permitan establecer soluciones a problemáticas virales (Jansz & Faulkner, 2024).

Principalmente se usan dos generaciones de tecnologías de secuenciación: Primera generación y HTS.

- a) Secuenciación Sanger (Primera Generación): Método clásico basado en la terminación de cadena mediante dideoxinucleótidos. Es un proceso de amplificación lineal con reacciones diferentes para cada sentido de lectura. La calidad de la lectura disminuye en los extremos, sin embargo, al realizar un ensamblaje informático de ambas secuencias, se genera un consenso libre de errores (Heather & Chain, 2016).
- b) Secuenciación de Alto Rendimiento (HTS) (Tamang, 2024): Permiten la lectura masiva y paralela de millones de fragmentos (Janz & Faulkner, 2024).

Capítulo 2

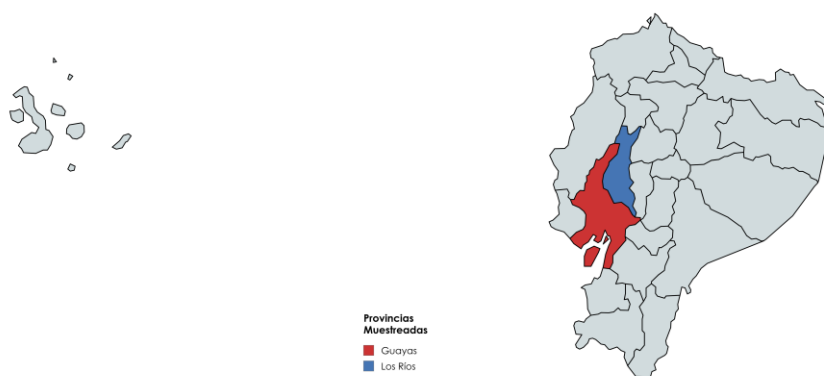
2. METODOLOGÍA.

2.1 Colección de muestras de banano

El estudio se llevó a cabo usando muestras de tejido vegetal (*Musa spp.*) recolectado entre los meses de septiembre y diciembre del 2025. Mediante la colaboración de productores, se coordinó el envío de muestras o se realizaron expediciones de campo en zonas estratégicas de las provincias del Guayas y Los Ríos (Figura 1). Adicionalmente, se incluyó un monitoreo en mercados locales de la ciudad de Guayaquil con el fin de evaluar la presencia del virus en el fruto comercializado.

Figura 1

Mapa de las provincias muestreadas del Ecuador



Nota. Ubicación geográfica del área de estudio. El mapa político del Ecuador destaca las provincias de Guayas y Los Ríos, seleccionadas para análisis. Figura adaptada de *Mapchart* (<https://www.mapchart.net/>)

Se aplicó un muestreo dirigido no probabilístico hacia la selección de plantas de banano que presentaban sintomatología compatible con el *Banana streak virus* (Figura 2), para la extracción de frutos y hojas. Los criterios de inclusión abarcaban: presencia de estriado clorótico o necrótico en el envés o nervadura y deformaciones en lámina foliar, lesiones de tipo acuosa o agrietamiento en los frutos, así como decoloración tisular y moteado necrótico en el pseudotallo.

Figura 2

Sintomatología de plantas muestreadas para diagnóstico molecular del Banana streak virus



Nota. Sintomatología observada en los tejidos vegetales analizados. Las imágenes detallan afecciones presentes en nervadura central, fruto y pseudotallo de algunos de los ejemplares seleccionados para análisis.

Se obtuvieron 152 muestras provenientes de 17 fincas (14 en Guayas y 3 en Los Ríos) y 6 mercados locales (Sauces 6, Saucos IX, La Florida, La Aurora, Vergeles y el Mayorista). El material biológico fue organizado, etiquetado, transportado y almacenado en cadena de frío a 4°C para evitar degradación tisular. Es importante destacar que durante los muestreos en campo se aplicaron normas de bioseguridad para evitar afectaciones de las unidades de producción.

En el laboratorio se descartaron especímenes en un estado de madurez avanzado que pudiera comprometer calidad de la extracción debido a la sensibilidad del tejido o aquellos cuyos síntomas no eran marcados, resultando en 43 muestras representativas seleccionadas para análisis molecular (Figura 3 y Tabla 1).

Figura 3

Muestras seleccionadas para elaboración de protocolo de diagnóstico molecular



Nota. Selección de material biológico para análisis. Se aislaron 43 muestras para ensayos provenientes de ejemplares que exhibían sintomatología característica.

Tabla 1

Provincia, localidad, sitio de muestreo, tipo y número de muestras obtenidas y analizadas.

Provincia	Ciudad	Mercado /Finca	Sitio de muestreo	Plantas	Frutos	Hojas	Hojas analizadas	Frutos analizadas	Muestras analizadas
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - La Aurora	3	3	0	0	0	0
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - La Florida	3	3	0	0	0	0
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - Mayorista	2	2	0	0	0	0

Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - Sauces IX	5	5	0	0	4	4
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - Sauces VI	3	3	0	0	0	0
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - Vergeles	3	3	0	0	0	0
Guayas	Simón Bolívar	Finca	Lorenzo de Garaicoa	2	2	0	0	2	2
Guayas	Cerecita	Finca	Cerecita	14	24	0	0	5	5
Los Ríos	San Juan	Finca	San Juan	11	63	0	0	5	5
		Finca		1	2	0	0	2	2
Los Ríos	Quevedo	Finca	Quevedo	5	40	0	0	10	10
Los Ríos	Guayaquil	Finca	Ventana	2	2	0	0	2	2
Guayas	Guayaquil	Finca	Tenguel- Liliana	1	0	1	1	0	1
Guayas	Guayaquil	Finca	Tenguel- Santa Rosa	1	0	1	1	0	1
Guayas	Guayaquil	Finca	Tenguel- San José, Manuel Sadán	1	0	1	1	0	1
Guayas	Guayaquil	Finca	Tenguel- María Augusto	2	2	2	2	1	3
Guayas	Guayaquil	Finca	Tenguel- Danielita	2	2	1	1	1	2
Guayas	Guayaquil	Finca	Tenguel- Julio Símbala	2	4	3	3	1	2
Guayas	Guayaquil	Finca	Tenguel- Rosita	2	2	2	2	1	3
Guayas	Salitre	Finca	Tenguel- Vizcaya	2	0	2	2	0	1
Total				54	16	13	13	34	43

Nota. Muestras del estudio y su origen.

2.2 Procesamiento preanalítico: Extracción de ácidos nucleicos

El genoma del BSV es de ADN bicatenario circular, lo que implica la síntesis activa de transcritos de ARN pre genómico en su ciclo de replicación. Por consiguiente, se decidió trabajar por medio de la extracción de ácidos nucleicos totales para poder recuperar ambas moléculas diana y aumentar la eficiencia diagnóstica al incrementar la disponibilidad del molde viral al

momento de realizar la detección molecular por medio de un paso previo de retro transcripción que permita generar ADN complementario.

Por otro lado, el banano es característico por un proceso acelerado de maduración junto con una alta tasa respiratoria y producción de etileno o fenoles, generando cambios proteómicos y bioquímicos en su cáscara. Estas cualidades dificultan la conservación de la integridad de la muestra y sus ácidos nucleicos para análisis, ya que las reacciones podrían ser inhibidas. Por ello, es obligatorio realizar las actividades en frío y estabilizadas (B. V. U. Kumar & Shashank, 2025).

Considerando el tejido del hospedero junto con la replicación del virus, se estandarizó un protocolo de extracción de ácidos nucleicos totales con base en la metodología de Waliullah et al. (2020), adaptado al tipo de tejido de las muestras. Esto permitió asegurar la integridad del ARN-ADN extraído y su eficiencia.

El procesamiento se realizó a partir de 100 a 120 g aproximadamente de tejido epidérmico (exocarpo) fresco de banano, el cual fue macerado en frío y en presencia de *buffer* de extracción con 2-betamercaptoetanol para evitar la oxidación fenólica y liberar los compuestos moleculares.

Para la purificación, se precipitaron las proteínas por medio de acetato de potasio, seguido de centrifugación a 13,000 rpm a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante recuperado fue sometido a precipitación con isopropanol en frío a 13,000 rpm durante 25 minutos. Finalmente se realizaron dos lavados por medio de *wash buffer* con etanol y sílice para eliminar sales residuales. El pellet obtenido fue secado a temperatura ambiente en *Speedvac* durante 10 minutos y suspendido en 45 µl de agua libre de nucleasas. La calidad y pureza se validaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y cuantificación por espectrofotometría *Nanodrop* (*Thermo Fisher Scientific*) con relación de radios de A260/A280 y A260/230 entre 1.5 y 2.0,

respectivamente. Durante el preprocesamiento de las muestras, se hicieron uso de reactivos, equipos y herramientas en frío para conservar la integridad de los ácidos nucleicos.

2.3 Detección viral: RT, PCR, Electroforesis, Purificación y Secuenciación Sanger

Para el diagnóstico viral se llevaron a cabo pruebas que permitieran elaborar un protocolo eficiente y eficaz. Debido a la particularidad de los pararetrovirus mencionadas, se varió entre el uso de RT-PCR y PCR convencional, seguidos por revelación en electroforesis, para selección de muestras positivas, purificación de bandas y secuenciación SANGER.

2.3.1 RT

Este procedimiento metodológico se llevó a cabo bajo el fundamento de la biología del BSV el cual implica la transcripción inversa de ARN pregenómico. Por consiguiente, la conversión de este ARN virtual en ADNc, sumado al ADN episomal propio del virus, incrementa sustancialmente la cantidad de molde disponible para la amplificación, permitiendo la detección del patógeno incluso en muestras de baja concentración viral.

Para la obtención de ADN complementario, se usaron dos enzimas transcriptasas reversas, M-MLV y *Scriptase*. Ambas se prepararon con 2 µl de *template* de ácidos nucleicos totales en un volumen final de 15 µl.

La mezcla de la reacción para la enzima M-MLV (200 U/ µl) contenía: 3 µl de buffer (5X), 0.5 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a 10 mM, 0.5 µl de cebadores al azar (*random primers*, 40 uM), 0.4 µl de inhibidor de ribonucleasa (*ribonuclease inhibitor*), 0.6 µl de enzima y 8 µl de H₂O destilada libre de nucleasas (*Ultrapure*).

Por otro lado, para la *Scriptase* se usó: 3 µl de buffer (5X), 1.5 µl de ditioneitol (dTT), 2.3 µl de dNTPs (2 mM), 0.5 µl de *random primers* (40 uM), 0.3 µl de inhibidor de ribonucleasa, 0.3 µl de enzima y finalmente 5.1 µl de H₂O destilada *Ultrapure*.

La incubación se llevó a cabo en el equipo *MiniAmp Plus Thermal Cycler* (Thermofisher Scientific). Las condiciones térmicas se ajustaron a los requerimientos específicos de cada enzima, enfocados en tres etapas, alineamientos, elongación, inactivación.

- M-MLV: 25°C por 5 minutos, 37°C por 1 hora y 85°C por 10 minutos.
- *Scriptasa*: 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos y 80°C por 10 minutos

El producto final contenía hebras de ADN genómico y ADNc sintetizado, siendo base sólida amplificación de regiones del virus del estriado del banano.

2.3.2 PCR

Con el objetivo de establecer un protocolo de detección eficaz, eficiente y funcional, se evaluó comparativamente la amplificación mediante dos moldes: ácidos nucleicos totales y ADNc sintetizado junto con el ADN episomal.

Para la detección específica del BSV, se seleccionaron dos juegos de cebadores reportados por Waliulluah et al. (2020), que amplifican dos regiones conservadas del marco de lectura abierto III (ORF3):

1. Set BSV 4673 / BSV 5317: Amplifica fragmento de 644 pb correspondiente a la región de la Proteasa Aspártica y Transcriptasa Reversa.
2. Set BSV 156 / BSV 962: Amplifica fragmento de 806 pb dirigido a la proteína de la cápside.

Se evaluó el rendimiento de cuatro enzimas de polimerasa comerciales tanto independientes como mezclas preformuladas (*BlueTaq Master Mix*, *GoTaq Green Master Mix*, *FastGene Green Master Mix* y *Green Script*). El protocolo se estandarizó usando las formulaciones *GoTaq Green Master Mix* (Promega) y *FastGene Green Máster Mix*, ya que ofrecieron la mayor eficiencia, reproducibilidad, especificidad y eficacia, además de permitir la carga directa sobre el gel de electroforesis.

Para poder garantizar la validez y calidad de los ensayos realizados se incluyó, en cada proceso realizado, el uso de controles positivos y negativos. Los componentes y volúmenes empleados para las enzimas seleccionadas, con una reacción final de 10 μ l, son los siguientes (Tabla 2 y 3):

Tabla 2

Composición de la mezcla de reacción para PCR de punto final de mezclas maestras (MasterMix)

Componentes	1rx (μ l)
<i>Buffer (2X)</i>	5
<i>Primer Forward (40uM)</i>	0.5
<i>Primer Reverse (40uM)</i>	0.5
<i>Template</i>	1
H ₂ O	3
Total de reacción.	10

Nota. Volúmenes de reactivos empleados para los protocolos de amplificación, con enzimas comerciales de mezclas maestras: *BlueTaq Master Mix*, *GoTaq Green Master Mix*, *FastGene Green Master Mix*.

Tabla 3

Componentes y cantidades usadas para las reacciones de PCR con enzima Green Script

Componentes	1rx (μ l)
<i>Buffer (10x)</i>	1
<i>dNTPs (10uM)</i>	0.2
<i>Primer Forward</i>	0.5
<i>Primer Reverse</i>	0.5
<i>Taq Enzyme</i>	0.1
<i>Template</i>	1
H ₂ O	6.7
Total de reacción.	10

Nota. Cantidades en μ l de reactivos usados para PCR de punto final con enzima *Green Script*.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador bajo el siguiente perfil: desnaturalización y separación inicial de las hebras a 94°C por 4 min, seguida de un programa de ciclado de 35 repeticiones que consiste en 3 pasos: desnaturalización a 94°C por 30 s, alineamiento de cebadores a las hebras separadas a 55°C por 30 s y el periodo de extensión donde la polimerasa se une a cebadores generando nuevas hebras a 72°C durante 1 min. El proceso finalizó con una etapa de extensión final a 72°C por 5 min.

2.3.3. Electroforesis

La verificación de la integridad de los ácidos nucleicos extraídos, así como la confirmación de la amplificación de los productos de PCR, se realizó por medio de un proceso de electroforesis en geles de agarosa.

Tanto la matriz de agarosa como el buffer para la corrida estaban compuestos por TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). El porcentaje de concentración de agarosa se ajustó según el objetivo del análisis. Para la visualización de ácidos nucleicos totales se emplearon geles 1% (p/v), en el caso de los amplicones virales el gel correspondía al 1.5% (p/v) de agarosa.

Además, se usó un Ladder de 100 pb (*Fast Gene 100 bp Blue Juice Vazyme*) para poder comprobar los tamaños de los amplicones establecidos por los cebadores.

Como agente intercalante para la visualización de la bandas se usó *Thiazole Orange* incorporado directamente en él. En el caso de los productos de PCR resultantes de los *Master Mix Gotaq* y *FastGene Green*, no se requirió de la aplicación de un *Loading Dye*. Sin embargo, en las pruebas preliminares realizadas con las enzimas que carecían de colorante y para la verificación de las bandas de ácidos nucleicos totales, se añadió *Loading Dye (Blue Juice)* a las muestras.

Finalmente, se realizó la separación electroforética a 90 V durante un periodo de 40 a 50 minutos. La visualización y foto documentación se llevaron a cabo en un transiluminador de luz azul (*FastGene FAS-DIGI Compact, NIPPON Genetics Europe*).

2.3.4 Purificación de amplicones y Secuenciación Sanger

Con el fin de poder caracterizar molecularmente y determinar la presencia del virus en las muestras, se seleccionaron los productos de PCR que mostraron perfiles electroforéticos con bandas consistentes con los tamaños de los amplicones conocidos.

Una vez identificada la muestra presuntiva positiva a BSV, fueron sometidas a una ronda de re-amplificación por duplicados para asegurar la disponibilidad de material genético suficiente. Se fraccionaron mediante electroforesis con un gel de agarosa.

El procedimiento de purificación inició con el corte cuidadoso del fragmento presente en el gel de agarosa. Se procesaron las muestras por medio del kit de purificación *Quick PCR Purification Kit (Invitrogen)*. Este paso se realizó con el objetivo de eliminar componentes ajenos a la región de interés que puedan actuar como interferentes en la secuenciación. El volumen final de la elución con agua libre de nucleasas y destilada fue de 40 μ l.

Para el envío al servicio de secuenciación Sanger, se prepararon dos reacciones diferentes para cada muestra (*Primer Forward* y *Primer Reverse*). Se estandarizó un volumen final de 15 μ l por cada tubo de reacción, constituido por 1 μ l del cebador correspondiente (40 uM) y 13 μ l para el producto de PCR purificado.

2.4 Análisis Bioinformático

El procesamiento de los datos crudos de secuenciación se llevó a cabo en el *software Geneious Prime* ([Geneious | Bioinformatics Software for Sequence Data Analysis](#)). Se realizó una fase inicial de edición y depuración de datos, se importaron las secuencias para su inspección manual. Se les asignaron codificaciones correspondientes a las muestras y se procedió a realizar cortes de los extremos (*trimming*).

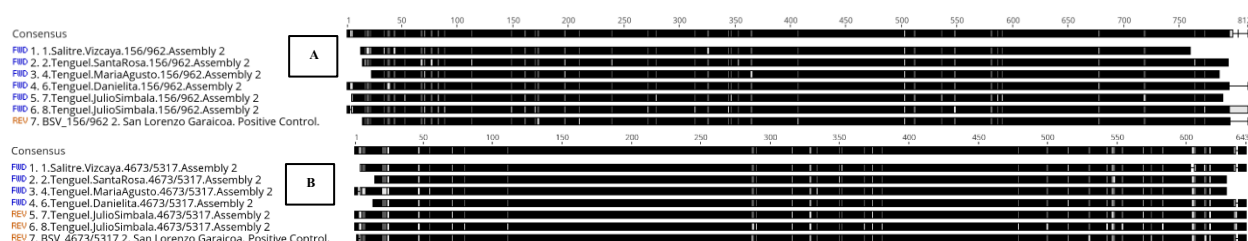
Las secuencias depuradas de buena calidad fueron ensambladas mediante la técnica de *novo* (*De Novo Assemble*), integrando las lecturas bidireccionales correspondientes a cada par de cebadores. Adicionalmente se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias locales de las

muestras diagnosticadas positivas al virus (Figura 4). Finalmente, con el fin de determinar la taxonomía de las secuencias consenso, se aplicó la herramienta de búsqueda de homología local *BLASTn* en la base de datos *GenBank del NCBI* ([Genes & Expression - Site Guide - NCBI](#)).

Para el estudio filogenético, las secuencias resultantes fueron alineadas por medio del algoritmo de MUSCLE.

Figura 4

Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas consenso de aislados ecuatorianos de Banana streak virus (BSV).



Nota. Alineamientos múltiples de secuencias generados mediante el *software Geneious Prime*. (A) Región parcial de la cápside amplificada con los cebadores BSV 156 / 962, evidenciando una secuencia consenso de aproximadamente de 800 pb. (B) Segmento de la poliproteína correspondiente a los cebadores BSV 4673 / 5317, con una longitud de 640 pb. Las barras oscuras corresponden al nivel identidad nucleotídica y la cobertura entre las secuencias alineadas.

Finalmente, se realizó la construcción de la historia evolutiva mediante el *software* MEGA12 por medio del método estadístico de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*), modelo de sustitución de Tamura-Nei incorporando una distribución Gamma (G) con 5 categorías discretas para modelar la variabilidad de las tasas evolutivas. Con respecto al tratamiento de datos faltantes, se aplicó la opción de eliminación parcial con una cobertura del 90%. La fiabilidad del árbol filogenético realizado se evaluó mediante una prueba de Bootstrap con 100 réplicas.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

3.1 Estandarización y optimización del protocolo de detección molecular.

El desarrollo de un protocolo de diagnóstico eficaz para el *Banana streak virus* requirió de la evaluación crítica de los componentes de las reacciones a usar. Por lo que, el primer resultado de esta investigación fue el establecimiento protocolo de diagnóstico molecular adaptado a la naturaleza recalcitrante de los tejidos de *Musa spp.*

3.1.1. Adaptación de la extracción de ácidos nucleicos

La implementación del protocolo base (Waliullah et al., 2020) requirió de pruebas y cambios para superar la rápida oxidación fenólica y obtener una buena calidad de ácidos nucleicos totales que permitieran un post-procesamiento de las muestras sin inhibir las reacciones enzimáticas posteriores.

Se determinó que las variables determinantes para obtener ácidos nucleicos de alta pureza consisten en:

- Realizar todo en cadena de frío (4°C).
- Trituración del tejido.
- Aplicación de agente reductor.
- Cantidad de lavados realizados.
- Elución con agua destilada libre de nucleasas.
- Incubación a temperatura ambiente luego de elución y a 65°C para suavizar pellet silica.
- Realización de todos los pasos de centrifugación a 4°C.
- Todos los reactivos deben estar previamente enfriados -20°C, a excepción del Buffer de extracción con 2-betamercaptoetanol.

Estos cambios permitieron la obtención de lecturas espectrofotométricas con concentraciones mayores a 50 ng/ μ l y relaciones de pureza ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) óptimas para análisis, tal como se muestra en la Tabla 4 y la Figura 5.

Tabla 4

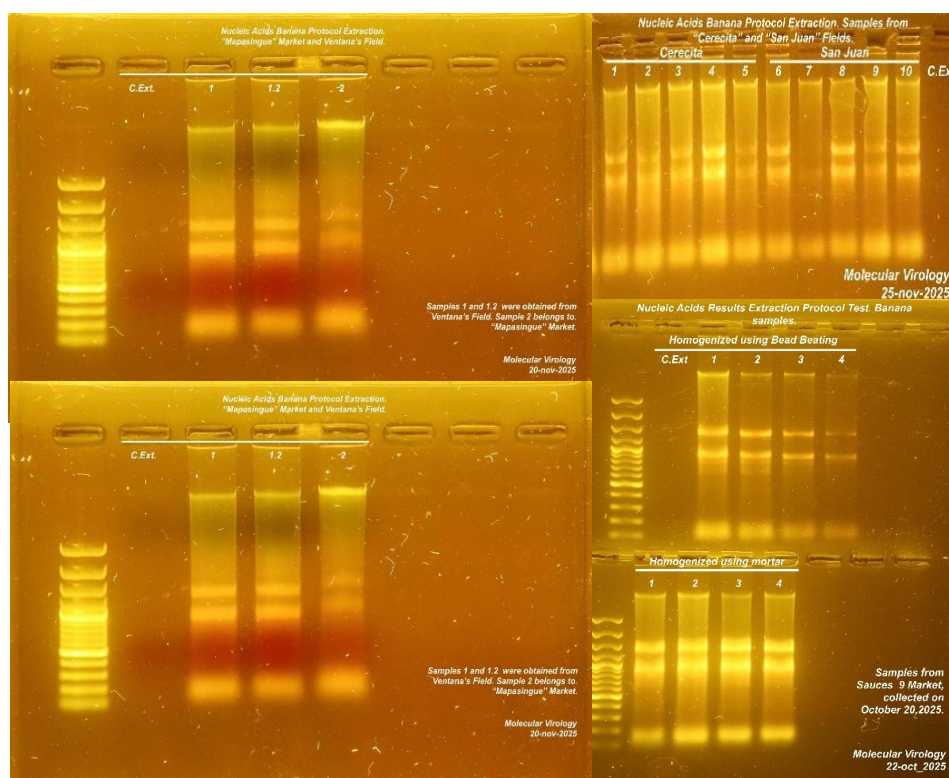
Parámetros espectrofotométricos de muestras de tejido vegetal (Musa spp.) con diagnóstico positivo: concentración y relaciones de absorbancia

Tipo	Provincia	Lugar	Tipo de muestra	Gramos de partida (g)	Concentración Ácidos Nucleicos (ng/ μ l)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
Finca	Guayas	Tenguel - Santa Rosa	Hoja	0.115	259,8	2,09	2,01
Finca	Guayas	Tenguel - María Agosto	Hoja	0.120	270,4	2,05	2,02
Finca	Guayas	Tenguel - Danielita	Hoja	0.100	293,2	2,13	2,03
Finca	Guayas	Tenguel - Julio Simbala	Hoja	0.108	334,8	2,08	2,06
Finca	Guayas	Tenguel - Julio Simbala	Hoja	0.098	249,7	2,12	2,06
Finca	Guayas	Tenguel - Julio Simbala	Fruto	0.112	147,6	2,03	1,55
Finca	Guayas	Salitre - Vizcaya	Hoja	0.100	168,5	2,04	1,94

Nota. Cuantificación realizada mediante espectrofotometría (*Nanodrop*). Los valores de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ cercanos a 2, indican el grado de pureza de las muestras con respecto a proteínas y contaminantes orgánicos sales presentes, respectivamente. Se detalla el rendimiento de la extracción (ng/ μ l) a partir del peso inicial del tejido y los índices de calidad de las muestras procedentes de Tenguel y Salitre que resultaron positivas en el análisis molecular final.

Figura 5

Evaluación de la integridad y calidad de ácidos nucleicos totales extraídos de fruto y hoja de Musa spp.



Nota. Compendio representativo de perfiles electroforéticos obtenidos durante fase de procesamiento de muestras en gel de agarosa al 1.5%. Se observan bandas nítidas y definidas correspondientes a subunidades de ARN, así como una banda de alto peso molecular atribuido al ADN genómico. La ausencia de un gran barrido degradativo indica la preservación de la integridad de los ácidos nucleicos. Además, se compara en el panel inferior derecho la eficiencia de dos homogenizaciones, una por *bead beating* y otra de mortero. Ambas muestran recuperación exitosa, sin embargo, la segunda incrementa la concentración final.

3.1.2. Optimización de la amplificación y evaluación del tipo de molde

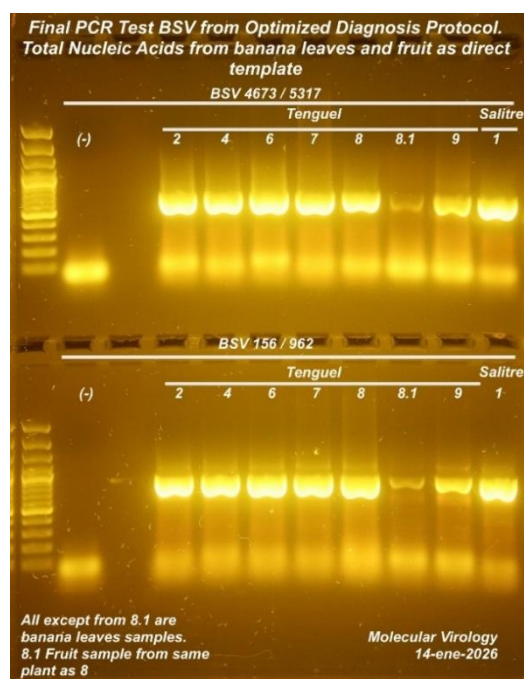
Una vez realizado un protocolo de extracción que asegure la calidad de los ácidos nucleicos totales base, se evaluó el desempeño de los componentes de la reacción de RT y PCR. Además, se comparó la eficiencia de la detección acorde al tipo de molde: PCR directa vs RT-PCR. Y así poder determinar la estrategia diagnóstica más eficiente.

3.1.2.1 Validación del tipo de *template*: PCR Directa vs RT-PCR.

En base a las pruebas realizadas de detección viral usando dos tipos de moldes iniciales, Ácidos nucleicos totales directamente (ADN genómico) y ADNc adicionado al genómico. Ante el desconocimiento inicial de la carga viral y para mitigar el riesgo de falsos negativos ante bajas concentraciones de ADN, se optó por usar inicialmente RT-PCR como método preferente. Sin embargo, los ensayos demostraron que es factible la detección del BSV directamente a partir de *template* de ácidos nucleicos, sin necesidad de realizar un paso de retro-transcripción previa (Figura 6). Esto es significativo ya que reduce el tiempo de análisis y costos, siendo una alternativa rápida y eficiente para muestras con concentraciones altas de ADN genómico. Con ambos métodos, al realizar electroforesis, en los geles se evidenciaron bandas de gran intensidad y definición en las muestras positivas, que aseguraban la precisión diagnóstica.

Figura 6

Ensayo final de perfil electroforético en gel de agarosa confirmando la detección de BSV en tejidos foliares y reproductivos



Nota. Validación del diagnóstico molecular mediante PCR de punto final. Panel Superior: Amplificación con los cebadores BSV 4673/5317. Panel Inferior: Amplificación con los cebadores BSV 156/962. Se observa la presencia de banda única e intensa en los tejidos foliares de Tenguel

y Salitre diagnosticadas positivas. Se destaca la muestra 8.1 correspondiente a tejido de cáscara de fruto (asintomático) que presenta amplificación comparable a la de su hoja de origen.

3.1.2.2 Evaluación del desempeño y calidad de los sistemas enzimáticos.

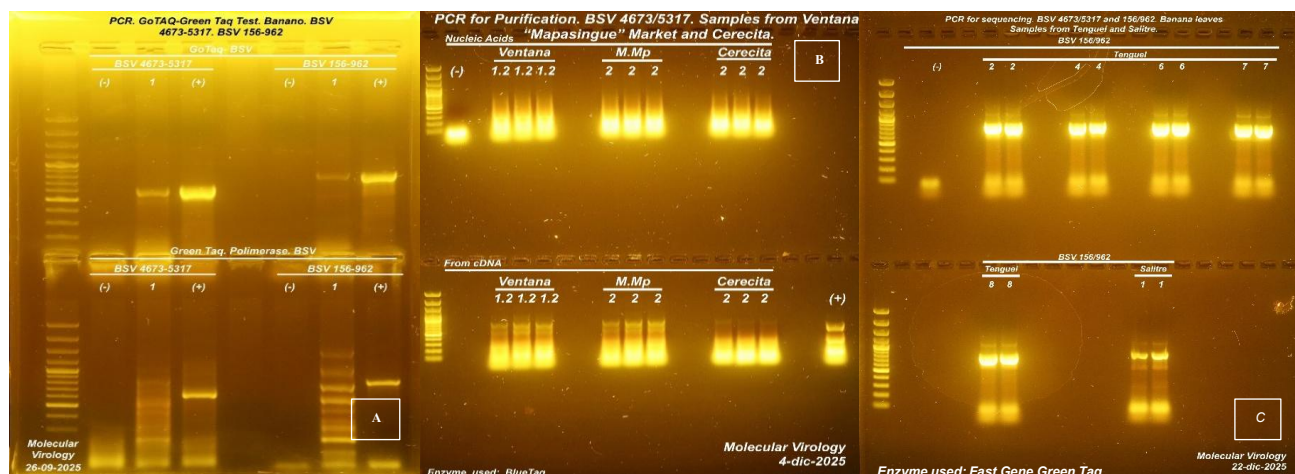
Con los sistemas enzimáticos evaluados de retro-transcripción (*M-MLV Reverse Transcriptase* y *Scriptase*), a pesar de requerir condiciones de incubación distintos, ambas enzimas demostraron ser válidas y eficientes para la síntesis de la primera cadena de ADNc.

La comparación entre las cuatro enzimas polimerasas usadas, evidenció que las dos que ofrecieron una mejor eficiencia fueron *GoTaq Green Master Mix* y *FastGene Green Master Mix*. Esto reveló que la calidad de la formulación enzimática es un factor de gran importancia. Las polimerasas de gran rendimiento lograron amplificar las regiones con bandas nítidas y definidas (Figura 7). Lo que sugiere que poseen mayor robustez antes inhibidores de PCR que puedan estar remanentes en la extracción.

Por el contrario, el uso de enzimas de gama estándar resultó en fallos de amplificación o bandas difusas, especialmente si el tipo de molde eran directamente los ácidos nucleicos totales. Aunque estas opciones representan un costo inicial menor, ante su falta de sensibilidad se recomienda usar previamente un paso de retro transcripción y no se considera la mejor alternativa para secuenciación.

Figura 7

Evaluación comparativa de eficiencia de amplificación de cuatro sistemas de enzimas de ADN polimerasa para el diagnóstico molecular de BSV



Nota. Ensayos de rendimiento por medio de formulaciones de enzimas. (A) Se compara el rendimiento de dos enzimas, *GoTaq Green Master Mix* y *Green Taq Polimerase*, evidenciando una amplificación robusta con bandas de alta intensidad con la primera enzima mencionada, e inespecificidad e ineficiencia con la enzima *Green Taq Polimerase*. (B) Se compara el rendimiento de la enzima estándar *BlueTaq* con dos tipos de *template*: cDNA + Ácidos nucleicos y Ácidos nucleicos totales. Observando la falta de eficiencia de la enzima para la detección. (C) Por último se evalúa la eficiencia de la enzima *FastGene Green Taq*, revelando bandas fuertes y definidas.

Por lo tanto, se estableció que, mientras la etapa de retro transcripción es flexible, es importante el uso de sistemas enzimáticos robustos que aseguren la sensibilidad analítica del protocolo, como es el caso de la PCR. Sin embargo, en caso de no realizar secuenciación, y sólo requerir detección, podrían ser usadas enzimas de menor gama con un paso previo de retro transcripción.

3.1.2.3 Especificidad de cebadores

El análisis realizado de las bandas con respecto a los diagnósticos realizados, arrojaron diferencias funcionales entre los dos sets de cebadores usados de la literatura.

- Set BSV 4673/5317 (Poliproteína, 644 pb): Posee una especificidad moderada. Durante los análisis moleculares realizados, se observó frecuentemente la aparición de productos

inespecíficos, así como bandas tenues consistentes con el tamaño del amplicón de los cebadores. La validación mediante secuenciación Sanger reveló una reactividad cruzada con el genoma del hospedero *Musa spp.* Por lo tanto, se establece que la presencia de bandas débiles de este set debe ser interpretadas con cautela, pueden representar falsos positivos. Al contrario, la presencia de bandas intensas y consistentes con el tamaño son indicativo de infección, confirmando el virus del estriado de banano.

- Set BSV 156/962 (Cápside): Posee una mayor especificidad analítica. No se presentaron bandas tenues o inespecíficas, solo amplicones limpios y fuertes en presencia del virus. Este fue seleccionado como set estándar para trabajo.

Basado en estos resultados, se establece que la mejor estrategia para evitar diagnósticos erróneos consiste en el uso de ambos sets de cebadores, incrementando la fiabilidad del resultado.

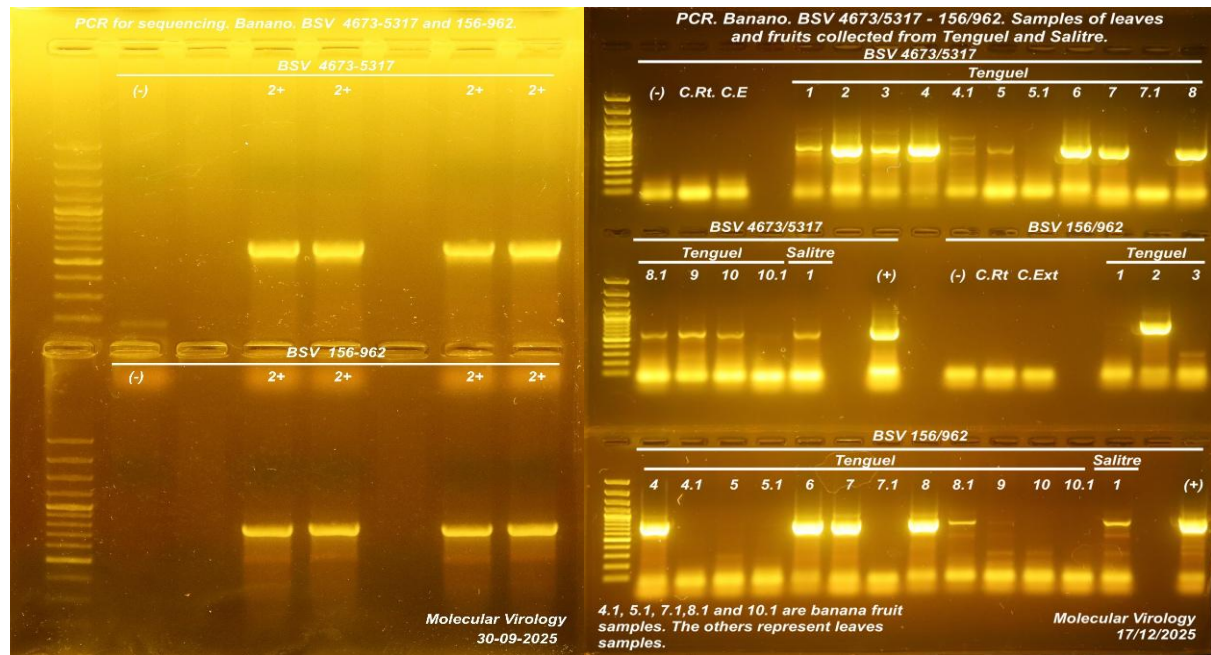
3.2 Detección viral y prevalencia en zonas de estudio, tejidos y correlación sintomatológica.

3.2.1 Detección viral y prevalencia.

Mediante el protocolo realizado de detección viral, se procesaron 47 muestras, tanto de hoja como de fruto. El diagnóstico molecular reveló la presencia del virus en 7 unidades productivas distintas, 5 pertenecientes a la parroquia de Tenguel, 1 en el cantón Salitre y finalmente 1 en la parroquia de San Lorenzo de Garaicoa, tal como se muestra en la Figura 8 y Tabla 5.

Figura 8

Resultados electroforéticos de análisis de muestras sospechosas de infección activa



Nota. Perfil de amplificación con los cebadores BSV 4673/5317 y BSV 156/962 de muestras recolectadas en: (A) San Lorenzo de Garaicoa (B) Tenguel y Salitre.

Tabla 5

Localidades analizadas y su diagnóstico.

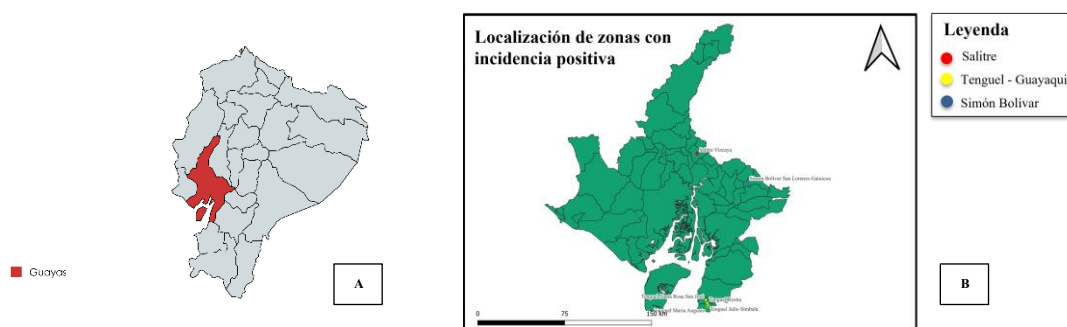
Provincia	Localidad	Mercado/Finca	Sitio de muestreo	Diagnóstico
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - La Aurora	Negativo
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - La Florida	Negativo
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - Mayorista	Negativo
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - Sauces IX	Negativo
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - Sauces VI	Negativo
Guayas	Guayaquil	Mercado	Guayaquil - Vergeles	Negativo

Guayas	Simón Bolívar	Finca	Lorenzo de Garaicoa	Positivo
Guayas	Cerecita	Finca	Cerecita	Negativo
Los Ríos	San Juan	Finca	San Juan	Negativo
Los Ríos	Quevedo	Finca	Quevedo	Negativo
Los Ríos	Guayaquil-Tenguel	Finca	Ventana	Negativo
Guayas	Guayaquil-Tenguel	Finca	Liliana	Negativo
Guayas	Guayaquil-Tenguel	Finca	Santa Rosa	Positivo
Guayas	Guayaquil-Tenguel	Finca	San José, Manuel Sadán	Negativo
Guayas	Guayaquil-Tenguel	Finca	Maria Augusto	Positivo
Guayas	Guayaquil-Tenguel	Finca	Danielita	Positivo
Guayas	Guayaquil-Tenguel	Finca	Julio Símbala	Positivo
Guayas	Guayaquil-Tenguel	Finca	Rosita	Positivo
Guayas	Salitre	Finca	Vizcaya	Positivo

Nota. Resultados finales del análisis realizado en localidades pertenecientes a las provincias del Guayas y Los Ríos basados en la revelación electroforética PCR de Punto Final.

Figura 9

Ubicación espacial de los casos positivos de Banana streak virus en zonas de estudio



Nota. Distribución geográfica de la incidencia del *Banana streak virus*. (A) Mapa general de la provincia del Guayas con presencia viral. (B) Detalle de las localidades específicas con casos

positivos: San Lorenzo de Garaicoa, Tenguel y Salitre. Mapa realizado en *Mapchart* (<https://www.mapchart.net/>) y *Software QGIS*.

La distribución geográfica de aquellos casos positivos se encontró en la provincia del Guayas, sin embargo, mostraron una prevalencia en la zona sur (Figura 9). Esta incidencia puede deberse a tres factores determinantes.

1. Cantidad de unidades de producción: Tenguel es una parroquia caracterizada por alta concentración de fincas bananeras colindantes. La proximidad entre las fincas incrementa el riesgo de dispersión de vectores biológicos e incluso el intercambio de material vegetal infectado entre los productores.
2. Manejo fitosanitario y control de malezas: Se observaron grandes variaciones con respecto al manejo de malezas en cada una de las fincas visitadas. Estos arvenses actúan como reservorio de virus y vectores, favoreciendo la prevalencia de afecciones sobre los cultivos.
3. Estacionalidad y condiciones climáticas: Las temperaturas cálidas, ambientes de humedad relativa media y precipitaciones, favorecen la proliferación de vectores. Estos factores junto con los del estrés ocasional de la planta, potencia la transmisión horizontal del virus como la expresión de los síntomas. Por lo tanto, en época de invierno, incrementa la incidencia del virus. Sin embargo, aunque los muestreos se realizaron en verano, había presencia de precipitaciones ligeras en los sectores, favoreciendo la humedad y presencia de vectores en la zona.

3.2.2 Evaluación de tejidos y correlación sintomatológica

Durante la fase de experimentación, se validó la versatilidad del protocolo para detectar material genético viral en dos órganos de la planta. Se confirmó la amplificación exitosa del virus del estriado del banano tanto en tejido foliar como en el epicarpio del fruto. Por lo que ambos tejidos pueden ser usados para el diagnóstico molecular.

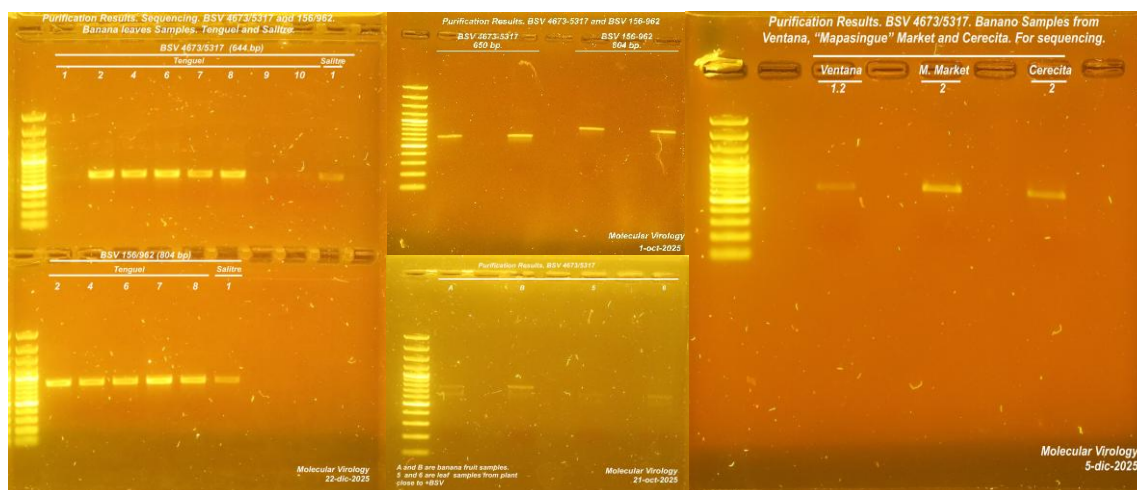
Sin embargo, si existe una discrepancia entre la sintomatología visual y los resultados obtenidos. Durante el muestreo, se seleccionaron plantas con síntomas en el pseudotallo y en la nervadura central de las hojas; sin embargo, los racimos correspondientes a estas plantas presentaban, en su mayoría, apariencia fenotípica asintomática. Esta observación de campo se correlacionó con los resultados obtenidos en laboratorio, donde se confirmó la presencia del virus en el tejido foliar, mientras que la detección en el epicarpio del fruto resultó negativa en la mayoría de los casos.

3.3 Identidad taxonómica.

Una vez realizadas las purificaciones (Figura 10) y el envío de muestras para la secuenciación Sanger, se realizó el análisis bioinformático de las secuencias consenso.

Figura 10

Verificación electroforética de la calidad y pureza de los amplicones previo a su envío para secuenciación Sanger



Nota. Visualización de los fragmentos recuperados tras realizar el proceso de purificación mediante columnas del Quick PCR Purification Kit (Invitrogen). Las imágenes compilan los resultados de las muestras presuntivas positivas. Se observan bandas nítidas correspondientes con los pesos moleculares esperados para los dos pares de cebadores usados (BSV 4673 / 5317 y BSV 156 / 962).

La búsqueda de homología mediante BLASTn mostró valores de identidad nucleotídica entre 98.50% y 100%, además, los valores E-value fueron de 0.0 con puntuaciones de Max Score

superiores 1400 perteneciendo a accesiones de referencia del Banana streak OL virus para todas las muestras identificadas como positivas, confirmando de forma inequívoca la circulación de la variante de Banana Streak OL Virus, descartando preliminarmente la circulación de otras especies de BSV. Para aquellas con un resultado no conciso durante las pruebas, se identificó como material vegetal perteneciente a *Musa*.

3.4 Análisis filogenético y distancia genética.

Con el fin de determinar la relaciones evolutivas y variabilidad genética de los aislados ecuatorianos de Banana Streak Virus, se desarrollaron árboles filogenéticos mediante el métodos de Máxima Verosimilitud en MEGA 12, basados en el modelo de sustitución de Tamura-Nei con distribución Gamma.

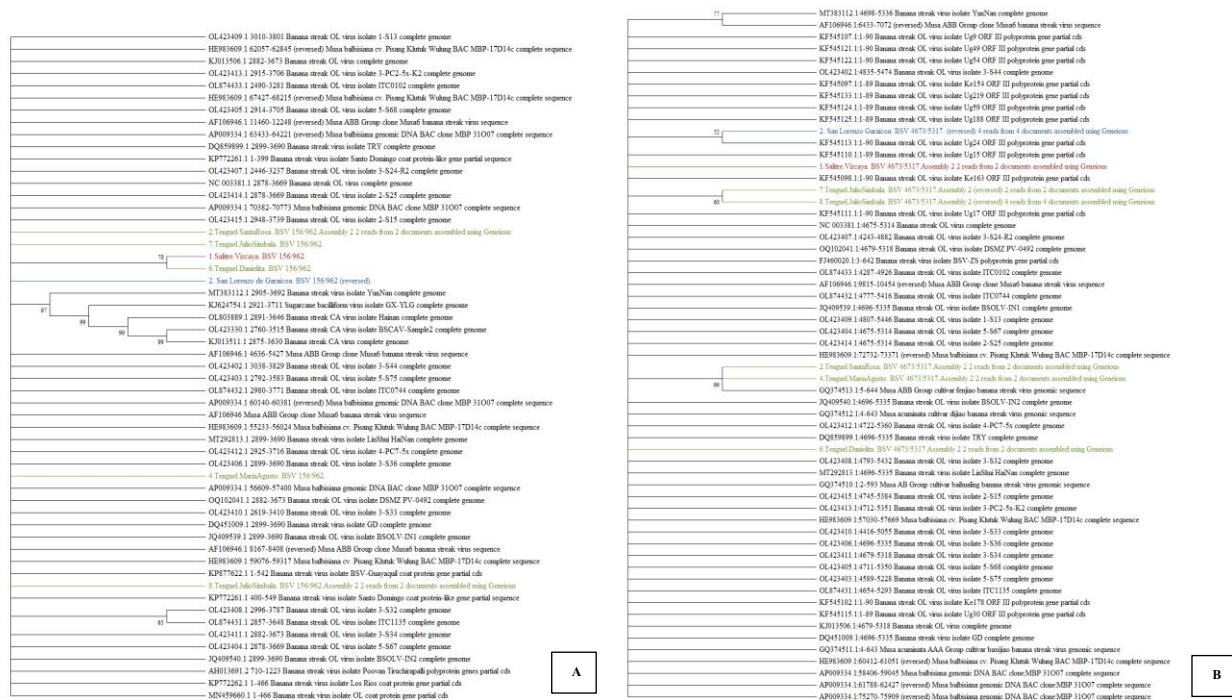
Se generaron construcciones filogenéticas diferentes con los dos amplicones evaluados de las regiones de cápside y poliproteína (Figura 11). En ambos casos se observó una topología congruente que evidenciaba la siguiente estructura:

- Todas las secuencias del estudio se agruparon en único clado monofilético bien definido, incluyendo las secuencias de referencias internacionales. La formación de este grupo compacto indica que el virus circulante en las zonas de estudio, pertenecen a la variedad BSV-OL sin mezclas con otras especies del complejo de BSV.
- El análisis de soporte realizado mediante bootstrap con 100 réplicas, arrojó valores elevados en los nodos principales. Especialmente, en el nodo que agrupa a los aislados ecuatorianos con las referencias globales presentó valores de soporte superiores al 85%. Con respecto a los nodos internos, se observaron valores moderados que reflejan la alta conservación genética entre las muestras.

Por lo tanto, no hay divergencia evolutiva significativa. Los aislados conforman una población viral homogénea.

Figura 11

Análisis filogenético de aislados de Banana streak virus basado en la secuencia parcial del gen de la cápside (set BSV 156 / 962) y la región de poliproteína (set BSV 4673 / 5317), pertenecientes al ORF3



Nota. Reconstrucción filogenética en MEGA12 mediante el método de *Maximum Likelihood*, usando el modelo de sustitución de Tamura-Nei + Gamma. El análisis se realizó a partir de los alineamientos de las secuencias recuperadas de las zonas de estudio con las secuencias de referencia de *GenBank* NCBI por medio de la herramienta de alineamiento local básica para nucleótidos (BLASTn). (A) Dendrograma generado a partir del producto de los cebadores BSV 156/962, evidenciando que los aislados de Salitre, Tenguel y San Lorenzo se ubican en el clado BSOLV con una estrecha relación evolutiva a variantes internacionales como BSV OL isolate 2-535 (B) Dendrograma generado a partir de producto de cebadores BSV 4673/5317, se mantiene la posición dentro del grupo BSOLV y se separan de otras especies como *Banana Streak CA virus*. Se posicionan a todas las muestras dentro del grupo de la especie BSOLV. Los valores de *Bootstrap* observados son consistentes con la similitud de identidad genética presente entre las muestras. La población viral es homogénea, sin divergencia evolutiva significativa en las zonas de estudio.

Por otro lado, el análisis de distancias genéticas por pares realizada en *Geneious Prime* entre las secuencias positivas, corroboró lo visualizado en los árboles. Al comparar los aislados locales se evidenció una alta conservación genética con poca variabilidad (Figura 12).

Figura 12

Matriz de porcentaje de identidad nucleotídica por pares (Pairwise distance) entre los aislados ecuatorianos

	1.Salitre.Viz...	2.Tenguel.S...	4.Tenguel....	6.Tenguel....	7.Tenguel.J...	8.Tenguel.J...	BSV_4673/...
1.Salitre.Vizcaya.4673/...		98.943%	98.480%	99.444%	97.574%	97.183%	98.354%
2.Tenguel.SantaRosa.4...	98.943%		99.106%	99.512%	98.211%	97.886%	98.862%
4.Tenguel.MariaAgusto....	98.480%	99.106%		99.269%	97.456%	97.178%	98.405%
6.Tenguel.Danielita.467...	99.444%	99.512%	99.269%		98.095%	97.778%	98.887%
7.Tenguel.JulioSimbala....	97.574%	98.211%	97.456%	98.095%		98.445%	97.664%
8.Tenguel.JulioSimbala....	97.183%	97.886%	97.178%	97.778%	98.445%		97.196%
BSV_4673/5317 2. San ...	98.354%	98.862%	98.405%	98.887%	97.664%	97.196%	

	1.Salitre.Viz...	2.Tenguel.S...	4.Tenguel....	6.Tenguel....	7.Tenguel.J...	8.Tenguel.J...	BSV_156/9...
1.Salitre.Vizcaya.156/9...		98.324%	99.051%	99.398%	97.928%	97.660%	98.995%
2.Tenguel.SantaRosa.1...	98.324%		98.953%	98.590%	97.677%	97.308%	98.462%
4.Tenguel.MariaAgusto....	99.051%	98.953%		99.215%	98.298%	98.168%	99.084%
6.Tenguel.Danielita.156...	99.398%	98.590%	99.215%		98.217%	95.751%	99.106%
7.Tenguel.JulioSimbala....	97.928%	97.677%	98.298%	98.217%		98.025%	98.194%
8.Tenguel.JulioSimbala....	97.660%	97.308%	98.168%	95.751%	98.025%		95.865%
BSV_156/962 2. San Lor...	98.995%	98.462%	99.084%	99.106%	98.194%	95.865%	

Nota. Análisis de divergencia genética realizado por medio del *software Geneious Prime*, empleando modelo p-distance. Los valores numéricos muestran el número de sustituciones de bases por sitio entre secuencias. Estos datos confirman la homogeneidad de la población viral y la ausencia de segregación genética entre las zonas geográficas evaluadas.

Capítulo 4

4.1 Conclusiones y recomendaciones.

4.1.1 Conclusiones

Tras la ejecución de las fases metodológicas y el análisis de los resultados obtenidos, se derivan las siguientes conclusiones.

- Como principal aporte de este estudio, se logró estandarizar un protocolo de diagnóstico molecular optimizado para tejidos de *Musa spp.*, determinando el uso estricto de una cadena de frío continua durante la fase de extracción, para neutralizar la oxidación fenólica y aumentar la calidad y pureza de los ácidos nucleicos extraídos. Aunque se validó la viabilidad de PCR directa, se estableció a la RT-PCR como método estándar del protocolo debido a su sensibilidad diagnóstica. Asimismo, se estableció que el uso de sistemas enzimáticos de alto rendimiento y la combinación de cebadores BSV 156/962 (detección primaria) y BSV 4673/5317 (confirmación) garantizan la especificidad necesaria para un diagnóstico fiable, superando las limitaciones de métodos convencionales.
- También se confirmó la presencia y circulación activa del virus en las zonas productoras evaluadas del Guayas. Esta distribución se vinculó directamente con factores de manejo agronómico, específicamente a la alta densidad de unidades productivas y al control de malezas que pudieran ser foco de vectores.
- Por último, la caracterización filogenética determinó inequívocamente que la variante viral aislada corresponde a la especie Banana streak OL virus (BSV-OL), exhibiendo una identidad nucleotídica superior al 98.5%. La topología del clado monofilético, poseía distancias genéticas mínimas, evidenciando una población viral homogénea sin evidencia de eventos de recombinación evolutivos.

4.1.2 Recomendaciones

Acorde a los hallazgos expuestos y los procedimientos realizados, se plantean las siguientes recomendaciones fundamentales para profundizar en el conocimiento del patógeno y optimizar estrategias de manejo:

- Implementar el protocolo de extracción en frío estandarizado en este estudio como metodología de rutina en los laboratorios locales, debido a su rendimiento en material vegetal recalcitrante.
- Realizar estudios futuros que incluyan el diseño de cebadores de alta especificidad que permitan identificar un espectro más amplio de variantes del complejo de BSV, evitando regiones homólogas que generen falsos positivos por una amplificación cruzada con material genético vegetal.
- Evaluar la presencia del virus en malezas circundantes para establecer un rol como reservorios naturales y diseñar estrategias de control de malezas más eficientes.
- Llevar a cabo estudios para implementar estrategias que permitan diferenciar partículas virales causantes de la enfermedad de secuencias virales endógenas integradas al genoma del hospedero.
- Realizar un seguimiento exhaustivo longitudinal que abarque y compare la presencia del BSV en ambas épocas climáticas del Ecuador. Permitiendo determinar con mayor precisión como las variaciones estacionales influyen en la expresión de síntomas, carga viral y dinámica poblacional de los vectores sobre las zonas productoras.
- Se recomienda ampliar el alcance del diagnóstico molecular viral hacia las especies de cochinillas presentes en las fincas.

Referencias

- Armijos, F., Flores, R., & Ochoa, M. (2004). *Manejo del BSV en plantaciones de banano y plátano*.
<http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/3831>
- Banabiosa. (2022, enero 30). Arbol del banano o planta del banano. *BANABIO S.A.*
<https://www.banabiosa.com/es/arbol-del-banano-o-planta-del-banano/>
- BananaExportNw. (2025, septiembre 29). Crecimiento de exportaciones de banano ecuatoriano.
Banana Export. <https://bananaexport.com/2025/09/29/crecimiento-de-exportaciones-de-banano-ecuatoriano/>
- Bhardwaj, P., Baranwal, V. K., Sharma, S. K., Srivastava, N., Prajapati, M. R., Kumar, R., & Gupta, N. (2025). Duplex RT-RPA/RPA assay for simultaneous detection of banana streak MY virus and banana bunchy top virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 137, 102616. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102616>
- Bhat, A. I., Hohn, T., & Selvarajan, R. (2016). Badnaviruses: The Current Global Scenario. *Viruses*, 8(6), 177. <https://doi.org/10.3390/v8060177>
- Diario, La Hora. (2006, mayo 11). *Virus ocasiona pérdidas en plantaciones de banano* [Periodismo]. LA HORA. <https://www.lahora.com.ec>
- Ewané, C. A., Meshuneke, A., Mbang, G. E., Wassom, F. D., Che, W. A., Beyang, G. T., Ndula-Nan, C. N., Silatsa, L. F., Kom Timma, J. W., Kengoum Djam, M.-P., Bindzi Abah, R. A. B., & Niemenak, N. (2024). Stimulatory Effect of *Tithonia diversifolia*-by Products on Plantain Banana Vivoplants in Nursery (A Review). *American Journal of Plant Sciences*, 15(09), 726-745. <https://doi.org/10.4236/ajps.2024.159047>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Higginson, E. J. (2007). Banana Streak Virus (Bsv): Características Biológicas, Epidemiología E Importancia Económica. *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal*, 11(4).

- Jansz, N., & Faulkner, G. J. (2024). Viral genome sequencing methods: Benefits and pitfalls of current approaches. *Biochemical Society Transactions*, 52(3), 1431-1447.
<https://doi.org/10.1042/BST20231322>
- Jaramillo, S. (2020). *Manual de Aplicabilidad de Buenas Prácticas Agrícolas para Banano*. Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro; pdf.
<https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/manu3.pdf>
- Jaufeerally-Fakim, Y., Khorugdharry, A., & Harper, G. (2006). Genetic variants of Banana streak virus in Mauritius. *Virus Research*, 115(1), 91-98.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.06.015>
- Khan Academy. (s. f.). *Secuenciación de ADN*. Khan Academy. Recuperado 17 de noviembre de 2025, de <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing>
- Khehra, N., Padda, I. S., & Zubair, M. (2025). Polymerase Chain Reaction (PCR). En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- Kumar, D., Rajan, S., & Srivastava, K. K. (2021). Response to phenological manipulation through planting time for productivity of banana (Musa AAA, Grand Naine) under subtropics. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 91(11), 1592-1596.
<https://doi.org/10.56093/ijas.v91i11.118537>
- Lau, B. F., Kong, K. W., Leong, K. H., Sun, J., He, X., Wang, Z., Mustafa, M. R., Ling, T. C., & Ismail, A. (2020). Banana inflorescence: Its bio-prospects as an ingredient for functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 14-28.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.023>
- Le Provost, G., Iskra-Caruana, M.-L., Acina, I., & Teycheney, P.-Y. (2006). Detección mejorada de virus episomales de *la raya del plátano* mediante PCR de inmunocaptura múltiple.

- Journal of Virological Methods*, 137(1), 7-13.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.021>
- López, M. (2025, febrero 27). Ecuador registra un sólido crecimiento del 2,95% en sus exportaciones de banano. *Cámara Marítima del Ecuador*.
<https://www.camae.org/ecuador/ecuador-registra-un-solido-crecimiento-del-295-en-sus-exportaciones-de-banano/>
- Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M., Martínez-Bolaños, L., Garrido-Ramírez, E., Canto-Canche, B. (2014). Enfermedades de importancia cuarentenaria y económica del cultivo de banano (*Musa* sp.) en México. *Revista mexicana de fitopatología*, 32(2), 89-107.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0185-33092014000200089&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Martin, K. (2019). *Revisión y Aplicaciones de la Transcriptasa Inversa y ADNc*. GoldBio.
<https://www.goldbio.com/blogs/articles/revision-aplicaciones-de-transcriptasa-inversa-adnc>
- Martinez-Solórzano, G. E., Rey, J. C., Urias, C., Lescot, T., Roux, N., Salazar, J., & Rodríguez, Y. (2023). Banana bunchy top virus: Amenaza para las musáceas en América Latina y el Caribe. *Agronomía Mesoamericana*, 34(1), 49577.
<https://doi.org/10.15517/am.v34i1.49577>
- Mocha-Cuenca, B. (2020). Diagnóstico de la presencia de Badnavirus en las plantaciones bananeras de la Provincia de El Oro. *Revista Ciencia Unemi*, 13(32), 100-108.
<https://www.redalyc.org/journal/5826/582661898010/html/>
- Monique, S. J., & Simmonds, V. (2016). Nutritional and Biochemical Composition of Banana (*Musa* spp.) Cultivars. En *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 49-81). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00003-9>

- Muñoz, A. A., & Vargas, M. R. (2025). Boletín de cifras—Comercio Exterior septiembre 2025. 2025. www.produccion.gob.ec
- Murillo, A. G. Á., Bermeo, M. del R. R., & Bolaño, R. J. T. (2021). Estudio socioeconómico de los productores de banano orgánico, Cantón Milagro, Ecuador. *Revista Tecnológica - ESPOL*, 33(3), 168-180. <https://doi.org/10.37815/rte.v33n3.869>
- Orfao, A., & Pinto, R. (2011). Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos. *Red Nacional Biobancos*.
- Ortiz, L. (2025, junio 27). *El banano ecuatoriano pasa por un buen momento, pero tiene tres retos por resolver*. Primicias. <https://www.primicias.ec/revistagestion/analisis/banano-ecuatoriano-buen-momento-retos-99386/>
- Pareek, S. (2016). Chapter 3—Nutritional and Biochemical Composition of Banana (*Musa* spp.) Cultivars. En M. S. J. Simmonds & V. R. Preedy (Eds.), *Nutritional Composition of Fruit Cultivars* (pp. 49-81). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408117-8.00003-9>
- Qamar, S., & Shaikh, A. (2018). Therapeutic potentials and compositional changes of valuable compounds from banana- A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.016>
- Salazar, R. (2025). *Grandes retos y desafíos para el banano ecuatoriano | El Productor*. <https://elproductor.com/2021/08/grandes-retos-y-desafios-para-el-banano-ecuatoriano/>
- Sharma, S. K., Vignesh Kumar, P., Poswal, R., Rai, R., Swapna Geetanjali, A., Prabha, K., Jain, R. K., & Baranwal, V. K. (2014). Occurrence and distribution of banana streak disease and standardization of a reliable detection procedure for routine indexing of banana streak viruses in India. *Scientia Horticulturae*, 179, 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.043>

- Shin, J. H. (2018). Nucleic Acid Extraction and Enrichment. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, 273-292. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33900-9_13
- SIPA. (2024). *Ficha Técnica del Cultivo de Banano* [Informativo]. Ficha Técnica del Cultivo de Banano. <https://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/bananos>
- Tamang, S. (2024, septiembre 9). *High Throughput Sequencing (HTS): Principle, Steps, Uses, Diagram*. <https://microbenotes.com/high-throughput-sequencing-hts/>
- Umber, M., Pressat, G., Fort, G., Plaisir Pineau, K., Guiougiou, C., Lambert, F., Farinas, B., Pichaut, J.-P., Janzac, B., Delos, J.-M., Salmon, F., Dubois, C., & Teycheney, P.-Y. (2022). Risk Assessment of Infectious Endogenous Banana Streak Viruses in Guadeloupe. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.951285>
- Waliullah, S., Fonsah, E. G., Ji, P., & Ali, M. E. (2020). First Report of Banana Streak Virus Infecting Bananas (*Musa spp.*) in Georgia, U.S.A. *Plant Disease*, 104(4), 1261-1261. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1931-PDN>