



INFORME DE CAPACITACIÓN JAPON

"Proyecto para el establecimiento de un sistema de alerta para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, patógeno causante de la marchitez del plátano y la banana, y estrategia de mitigación del patógeno"

Elaborado por: Maria del Carmen Gonzales Miranda

Durante la estadía en Japón, se realizaron las siguientes actividades.

I. Primera semana 10 de febrero al 14 de febrero

- Visita a la Universidad de Tottori

En la ciudad y capital de la prefectura de Tottori, Japón. Se realizó el recorrido de las instalaciones de la universidad o escuela de graduados en Agricultura,

- a. Donde se realizó un dialogo e intercambio de las investigaciones del Dr. Kodama y el Dr. Kido y las metodologías realizadas para aislamientos de bacterias, selección, purificación y antagonismos realizados en Perú. Por ejemplo, se mostraron ensayos de inhibición de Bacterias seleccionadas y aisladas de Okinawa con una cepa de *Fusarium*, las principales recomendaciones fue que no solo se limite el estudio al antagonismo dual sino también adicionar metodologías para determinar el antagonismo por metabolitos, también deberíamos conocer las características fisicoquímicas del suelo, identificación de la biología del suelo y trabajar con consorcios finalizadas la selección de cada organismo.
- b. Se realizaron a aislamientos de baterías y actinomicetos de suelos de Okinawa con dos medios de cultivo.
 - Medios de cultivo Not rich agar (SMSA):
 - Peptona-----10 g
 - Glicerina.....5 ml
 - Ac. Hidrolysate de caseina... 1g
 - Agar.....18g
 - Agua1 litro
 - Despues del autoclavado se añadió 10mg de Cycloheximide y estandarizar el pH a 6.8.
 - Medio de Cultivo Yeast peptone agar (YPA)
 - Yeast extracto.....5g
 - Peptona.....10 g
 - Agar.....15 g
 - Agua.....1 Litro.
 - Despues del autoclavado añadir 10 mg de cycloheximide y estandarizar el pH a 6.8



Estos medios se plaquearon en placas de Petri estériles y se utilizaron para el aislamiento a partir de suelo mediante diluciones seriadas sin shock térmico.

c. Capacitación de Análisis de secuencias por filogenia

Mediante el programa MEGA (software gratuito) que nos sirve para alinear secuencias genéticas, construir árboles filogenéticos con la finalidad de distinguir las relaciones evolutivas entre organismos, se buscó secuencias en formato FASTA a través del NCIB. A partir de secuencias de ADN, ARN o proteínas, podemos inferir cómo están relacionadas, cuándo divergen, y cómo evolucionaron.

Segunda Semana del 17 de febrero al 21 de febrero

- **Preparación de material y medios de cultivo.**

Objetivo: Reactivaciones de Bacterias conservadas de muestras de Tingo María y pruebas de antagonismo.

Se prepararon medios sólidos como PDA (papa dextrosa agar), agar nutritivo (Agar nutritivo) y líquido TSB (Trypto-Casein Soy Broth), se esterilizó y después del auto clavado el medio Agar nutritivo se dispuso en placas de 9 cm de diámetro y el medio TSB fue dispensado en tubos Falcon de 15 cm.

- **Pruebas para test de antagonismo**

a. Reactivación de las bacterias aisladas y conservadas de Tingo María en febrero del 2024, durante la estancia a Japón. Dentro del grupo de las bacterias conservadas se seleccionaron 15 aislamientos para evaluar su actividad debido a que se observó en 5 de estos su capacidad antagónica y su viabilidad adicionalmente corroborar la viabilidad de otras 10 cepas más que habían perdido actividad de crecimiento en las conservaciones llevadas a Perú. Los códigos son los siguientes:

Códigos	Tingo María S° Ago 2023
009	Fundo el Sol
013	Fundo el Sol
014	Huanganapampa FOC
015	Huanganapampa FOC
016	Manzano FOC Liz Timoteo
017	Huanganapampa FOC
019	Huanganapampa FOC
021	Fundo el Sol FOC



022	Fundo el Sol
023	Huanganapampa FOC
024	Huanganapampa FOC
037	Fundo el Sol
039	Manzano Liz Timoteo
040	Fundo el Sol
041	Huanganapampa

- b. Las cepas conservadas se reactivaron usando el medio líquido TSA y fueron incubados por 18 horas a temperatura de 37°C y 150 rpm.
- c. La suspensión fue sembrada por estriamiento en placas conteniendo medio Agar nutritivo estéril para el desarrollo de las colonias y corroboración de ser colonias puras, una vez desarrolladas se cogerá una sola colonia de cada placa y será nuevamente inoculado en medio líquido TSB para incrementar biomasa y realizar las pruebas de antagonismo.
- d. Las pruebas de antagonismo fueron realizadas mediante un screening de tres cepas por placa más un testigo por cuatro repeticiones. Para esto se utilizó medio PDA estéril sin antibiótico en placas de 9 cm de diámetro. Donde se colocó una rodaja del patógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* STR4., (código 23 TM.). 24 horas antes de colocar el caldo bacteriano de cada cepa.
- e. Como actividad complementaria se repicaron y se purificaron colonias bacterianas aisladas de suelos de Okinawa trabajadas en la Universidad de Totori.

II. Tercera Semana del 24 de febrero al 28 de febrero

- a. Evaluación de las pruebas de antagonismo y selección de las cepas que mostraron inhibición respecto al testigo.
- b. Preparación de medio PDA y desinfección de material.
- c. Evaluación y medida de la calidad de ADN por dos métodos de cuantificación mediante el nanodrop y Qubit. (Anexo adjunto)
- d. Prueba de PCR para la amplificación de ADN a partir del segmento del gen 16S. Se trabajaron a partir de ADN extraído previamente de 24 muestras de suelo que fue colectado de suelos de Tingo Maria el periodo agosto 2024, como parte de la tesis doctoral de C. Trigoso.

Se utilizaron las siguientes reacciones:



Long. Amp. 2 x master mix	12.5 ml
Primer 27 Forgard	1 ml
Primer 188 Reverse	1ml
Template DNA	x ml
<u>Milli Qk</u>	<u>10.5- xml</u>

25 ml

*** Ciclos, Temperaturas y tiempos PCR: 95°C por 1min (95°C x 20seg, 55°C x 30 seg, 65°C x 2 min) x 25 ciclos, 65°C x 5 min.

- c. Terminados ciclos de proceso del termociclador se realizó la prueba de electroforesis para la detección de las bandas amplificadas, se utiliza un gel de agarosa 1,2 % con el buffer TAE 0.5% para la detección de los productos de la PCR amplificados utilizando ADN bacteriano.

*** La amplificación del ADNr 16S se consigue mediante un termociclador gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado.

III. Cuarta Semana del 03 de marzo al 07 de marzo

- a. Incremento de biomasa en medio liquido TSB para el Antagonismos de 7 bacterias aisladas de Okinawa.
- b. Se repitieron las pruebas de antagonismo con las bacterias que se seleccionaron en la primera prueba para este caso las cepas 016, 009, 037, 040, 041 y 039.
- c. Extracción de ADN a partir de muestras de suelo, se prepararon tres muestras de suelo: 6-4, 8-1, 4-4. Se utilizo el protocolo **de Kit de extracción de ADN**. Se siguieron los pasos de centrifugación inicial eliminando los sediméntenos y trabajar con el sobrenadante, mediante la adición de reactivos y enzimas específicas en cada una de las muestras de suelo en diferentes momentos y tiempos de centrifugación se obtuvo la solución de ADN para las pruebas posteriores.
- f. Estandarización de las concentraciones de 24 muestras de ADN mediante Qubit, amplificación por PCR y electroforesis de las muestras, para la ejecución de análisis metagenómico.



IV. Quinta Semana del 10 de marzo al 14 de marzo

- **Preparación de 24 muestras para el análisis de metagenómica previamente se cuantificaron y calidad de las muestras de ADN mediante el nanodrop y el Qiubit.**

El objetivo es capturar la mayor diversidad microbiana posible presente en esas muestras.

- Para la preparación de las librerías genómicas se siguió el protocolo recomendado por: **Rapid sequencing DNA - 16S Barcoding Kit 24 V14 (SQK-16S114.24)**. Donde se preparó cada una de las muestras de ADN con agua libre de nucleasas con 15 ul en tubos de PCR y se adicionó LongAmp Hot Start Taq 2X Mezcla Maestra 25ul para llegar a un total de 40ul.
- Con las puntas de pipeta limpias, se perforó con cuidado la superficie de la lámina de los códigos de barras requeridos. Con una pipeta multicanal, se transfirió 10 µl de cada código de barras 16S a los tubos de PCR que contienen muestras respectivas.
- Adición de reactivos y amplificación por PCR
- Cebado y carga de la celda de flujo MinION y GridION posteriormente las bibliotecas se pipetea hacia arriba y hacia abajo justo antes de cargar, se añade 75 µl de la biblioteca preparada a la celda de flujo a través del puerto de muestras SpotON gota a gota. Debe Asegúrese de que cada gota fluya hacia el puerto antes de agregar la siguiente.
- Una vez cargada la celda de flujo, la ejecución de la secuenciación se puede iniciar en MinKNOW (software de secuenciación) que controla el dispositivo, la adquisición de datos y la llamada base es en tiempo real.

V. Sexta Semana del 17 de marzo al 21 de marzo

- Preparación de medios sólidos PDA y líquidos TSB para caldo bacteriano y material para pruebas de antagonismo con dos cepas de FOC código: MAS-I y 23TM.
 - Reactivación de bacterias para antagonismo.
 - Pruebas de antagonismo con 54 cepas de bacterias asiladas de suelos de tingo Maria como parte de la tesis doctoral de C. Trigo.
 - **Extracción de ADN de Bacterias a partir de su crecimiento en biomasa en medio líquido y electroforesis.**
- 500 ul de la suspensión bacteriana se colocó en un tubo Eppendorf



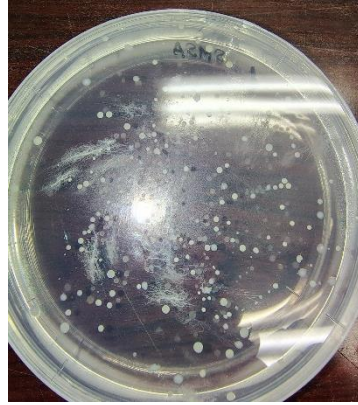
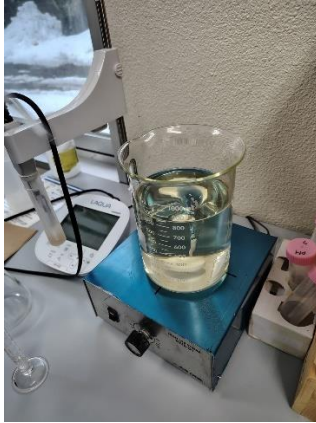
- b. Se Colocó la muestra a 95°C por 10 min., terminado este proceso se colocó directamente en hielo.
- c. Se centrifugó a 1000 rpm por 2 miny tomar el sobrenadante en otro tubo de 1.5 ml. Para PCR.
- d. Se realizo PCR con las siguientes instrucciones:
 - Template DNA (fron 3) 1 ul
 - Water 10.5 ul
 - 27 F primer (10 um) 0.5 ul
 - 1488 R primer (10um) 0.5 ulTotal: 25 ul por cada muestra.
- e. Se observó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa (el tamaño de amplificación debe ser alrededor de 1500-2000pb.

VI. COMENTERIOS:

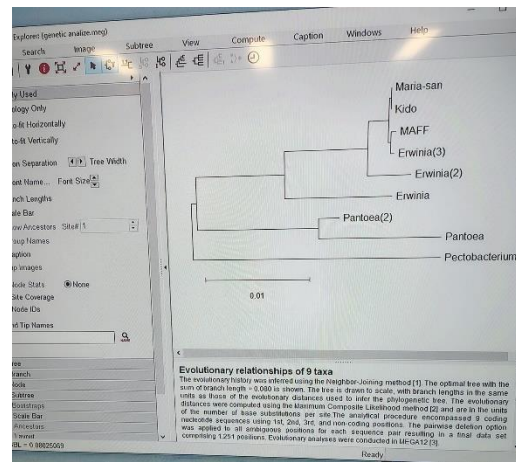
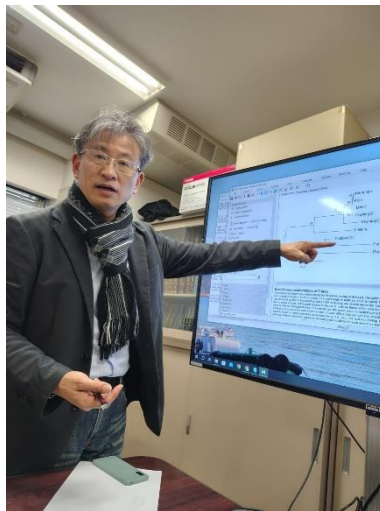
La capacitación en Japón representó una experiencia formativa y enriquecedora tanto a nivel técnico como académico. Me permitió fortalecer conocimientos en técnicas de aislamiento, cultivo, caracterización y evaluación de bacterias con potencial antagónico contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Destaco especialmente el aprendizaje práctico en herramientas moleculares como la PCR, la extracción de ADN de suelos y bacterias, la cuantificación de ADN y la secuenciación genómica mediante metagenómica.

Además, el intercambio científico con los investigadores profesores y estudiantes doctorales fue clave para ampliar la perspectiva en el manejo de enfermedades, considerando no solo la acción directa de microorganismos antagónicos, sino también el rol de la microbiota del suelo y los metabolitos secundarios. Esta experiencia refuerza la importancia de la investigación colaborativa, el uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación y el desarrollo de estrategias sostenibles para la mitigación de enfermedades en cultivos como banano y plátano.

ANEXOS:



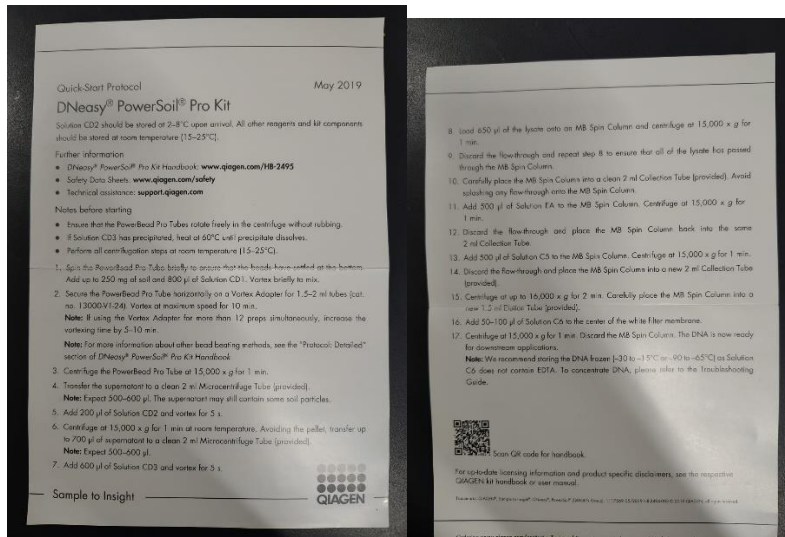
1. Preparación de medios de cultivo y aislamiento de Bacterias



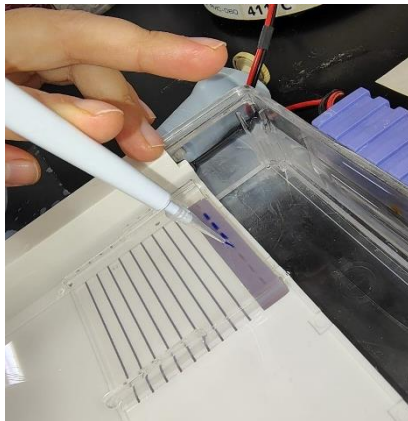
2. Alineación de secuencias y construcción de arboles filogenéticos.



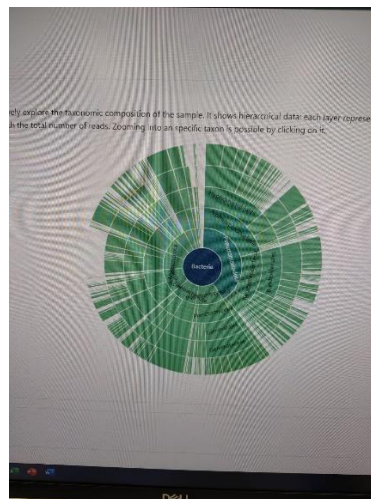
3. Reactivación y pruebas de antagonismo de Bacterias de Tingo Maria



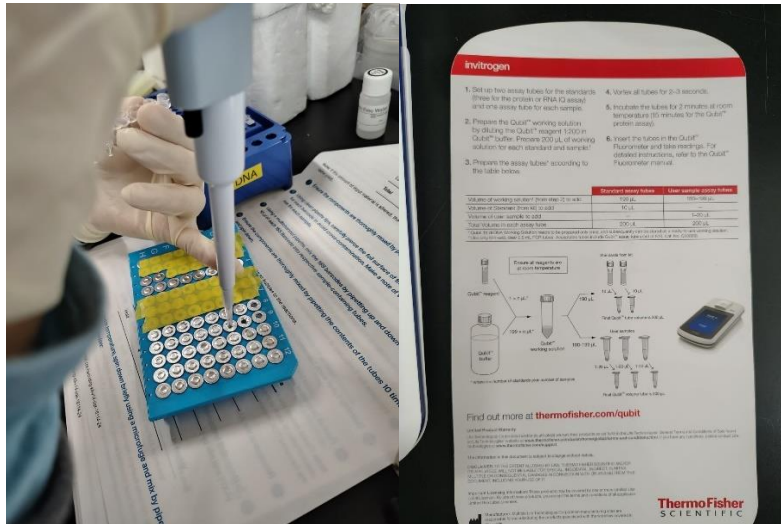
4. Protocolo de extracción de ADN a partir de suelo



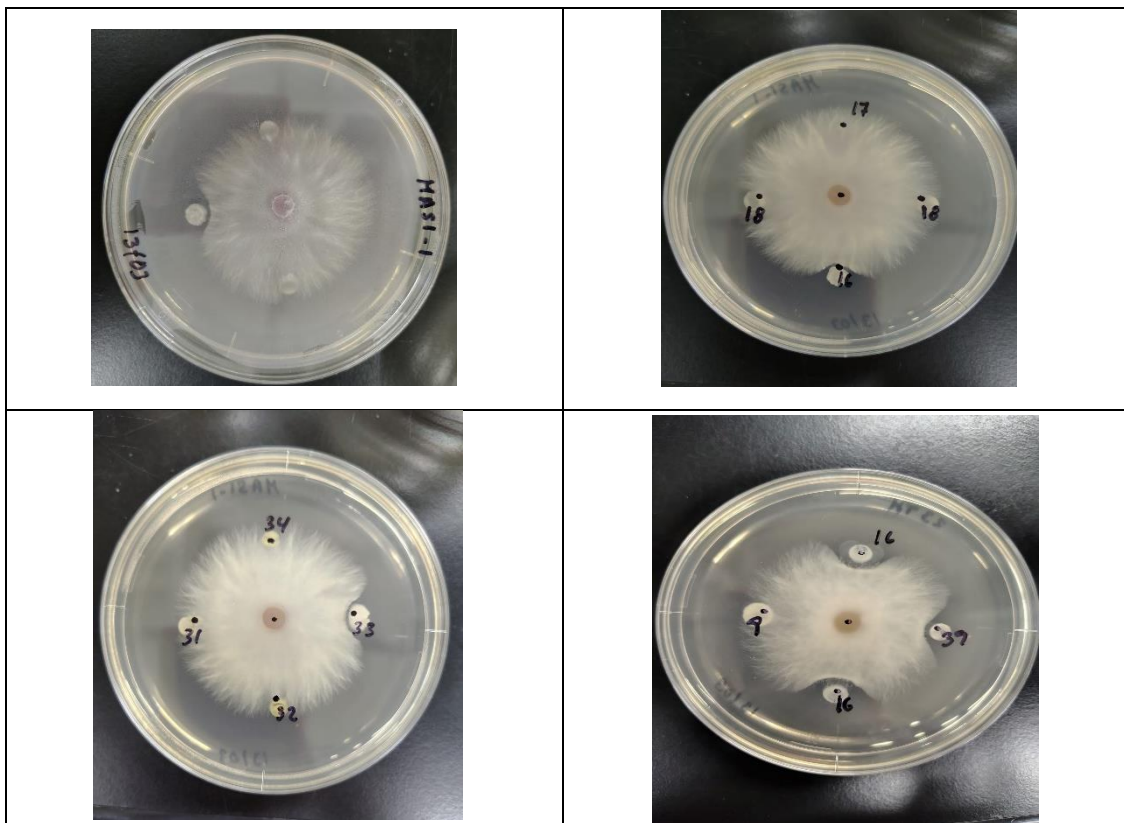
5. Verificación de la amplificación de ADN por electroforesis.



6. Análisis de Metagenómica



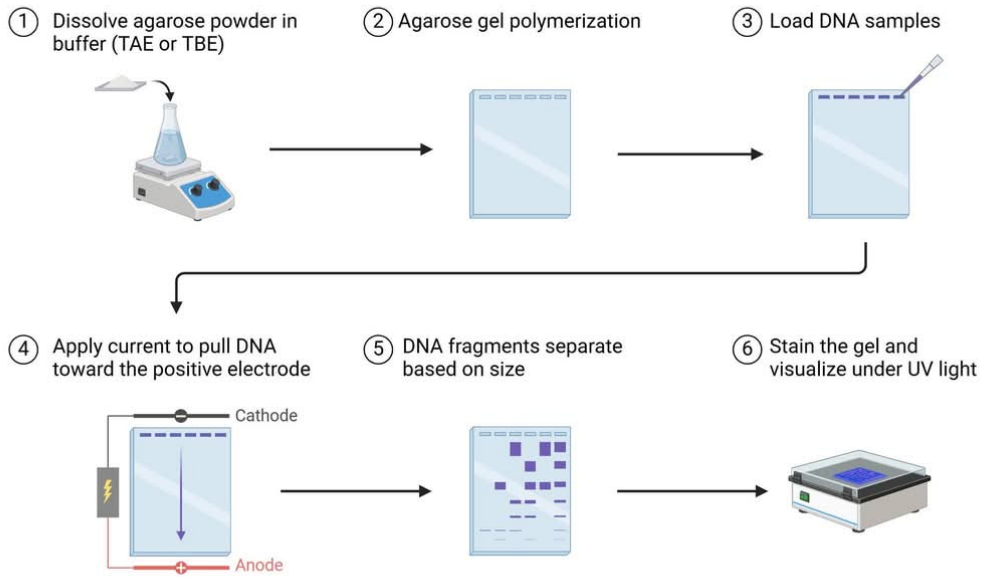
7. Preparación de librerías genómicas y protocolo para cuantificación y calidad de ADN.



8. Selección de bacterias por screening para antagonismo contra *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*



Agarose Gel Electrophoresis



9. Esquema para la preparación de gel de agarosa.