



**Evaluación de la expresión del gen RGA2 de banano asociado a la resistencia a
Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* presente en el Banco de Germoplasma de Banano
de la EETP-INIAP**

Anaguano Peralta, Alexis Mauricio

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

25 de Agosto de 2023



Tesis Alexis Anaguano.txt

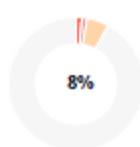
Scan details

Scan time: August 22th, 2023 at 21:40 UTC

Total Pages: 54

Total Words: 13285

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	1.5%	194
Minor Changes	1.2%	161
Paraphrased	5.3%	705
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

Plagiarism Results: (18)

202072181721Gula Andina Final.pdf 2.7%

<https://www.comunidadandina.org/staticfiles/202072181721...>

GUÍA ANDINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE Fusarium Raza 4 Tropical (R4T)
Fusarium oxysporum f.sp. cubense (syn. Fusarium odoratissimum) agente...

TF_Template_Word_Windows_2016 1%

https://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/bitstream/rd_ikiam/63...

Borys Leon

UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM Facultad de Ciencias de la Vida
Ingeniería en Biotecnología Aplicación de la minería genómica en ba...

(PDF) GUÍA ANDINA PARA EL DIAGNÓSTICO DE Fusar... 0.7%

https://www.academia.edu/44477705/gu%C3%8da_andina_p...

Mario Iza Arteaga

Academia.edu no longer supports Internet Explorer. To browse Academia.edu
and the wider internet faster and more securely, p...



Certified by
Copyleaks

About this report
help.copyleaks.com

copyleaks.com
in f @ t



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: “**Evaluación de la expresión del gen RGA2 de banano asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* presente en el Banco de Germoplasma de Banano de la EETP-INIAP**” fue realizado por el señor **Anaguano Peralta, Alexis Mauricio**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 23 de agosto del 2023



firmado electrónicamente por:
**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**

.....
Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

C. C.: 1713443479



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Anaguano Peralta, Alexis Mauricio**, con cédula de ciudadanía n° 1718582198, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de la expresión del gen RGA2 de banano asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* presente en el Banco de Germoplasma de Banano de la EETP-INIAP”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 22 de agosto del 2023

Anaguano Peralta, Alexis Mauricio

C.C.: 1718582198



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Anaguano Peralta, Alexis Mauricio**, con cédula de ciudadanía n° 1718582198, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de la expresión del gen RGA2 de banano asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* presente en el Banco de Germoplasma de Banano de la EETP-INIAP”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 22 de agosto del 2023

.....
Anaguano Peralta, Alexis Mauricio

C.C.: 1718582198

Dedicatoria

El presente trabajo de titulación va dedicado a una persona muy especial, quien hasta el día de hoy siguen siendo mi razón para seguir adelante. Mami, este gran esfuerzo no es solo mío, es el fruto de trabajo que tu pusiste en mí, es el granito de arena que ibas sembrando cada día. Lastimosamente, y por alguna razón dejaste este mundo a causa de esa terrible enfermedad. Quiero que sepas que, si hubiese dependido de mí, te hubiera entregado mi vida sin pensarlo dos veces, pero se con certeza que, si de eso dependiera, hubieras elegido mil veces ser tú que tus hijos o seres queridos. No me queda más que seguir adelante y continuar peleando esta dura batalla que es aprender a vivir sin ti. En honor a todo tu esfuerzo, dedicación, cariño y comprensión pienso lograr grandes cosas siempre en memoria tuya mami. Espero que, desde el cielo, te sientas tranquila y por fin hayas podido descansar de esa terrible batalla que estabas padeciendo. La mejor inversión que dejaste en este mundo somos mis hermanos y yo, ten por seguro que ninguno te va a fallar y yo siempre estaré pendiente de lo que alguna vez tu siempre quisiste. Por esto y mucho más este trabajo quiero que sea tuyo y donde te encuentres estes feliz ya que merecías esto y mucho más.

Agradecimientos

Agradezco a mi tutor de tesis, Francisco Flores Flor, PhD. por su colaboración, tiempo, disposición y ayuda en la elaboración y seguimiento de este tema de investigación. Además, por permitirme realizar mi proyecto de titulación en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen.

A Antonio Bustamante, PhD. por darme la confianza en realizar el presente proyecto de investigación con las diferentes accesiones de banano de la EETP-INIAP y utilizar diferentes genes que se analizaron en investigaciones previas.

Al Ing. Borys León, por haberme guiado durante la elaboración de mi proyecto de titulación y facilitado el contacto con la EETP-INIAP.

Al técnico de IDgen Ing. Francisco Garrido y la Ing. Vanessa Gaona, por su paciencia y consejos durante el desarrollo de esta investigación. También por su amistad y conocimientos impartidos durante mi estadía en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen.

A todos los docentes y técnicos que conforman la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por sus conocimientos impartidos durante mi formación profesional de la cual he aprendido demasiado.

A mi madre Angela Andrea Peralta Ushiña, por haber sido ese apoyo incondicional que siempre necesite para seguir adelante. Gracias a sus consejos, carisma, cariño y paciencia hasta el día que partiste, siempre serás el modelo de persona que quiero ser. A mi padre Víctor Anaguano, por haberme enseñado que por más difícil que sea una situación siempre tengo que levantarme y continuar por esa persona que ahora nos cuida desde el cielo.

A mis hermanos Roy, Lizeth y mi mascota mordelón, por tener el agrado de continuar con su compañía y darme aliento a continuar con mi formación profesional.

Mientras ustedes se encuentren bien y mi mami nos de la bendición de continuar con salud podremos salir adelante. Ahora que el corazón de la familia ya no se encuentra, como hermano mayor siempre voy a estar pendiente de ustedes.

A mis abuelitos y tías Inés, Judith, Margoth, Sonia, Elisa, por su apoyo y amor durante todo este proceso. Por su compañía, durante la enfermedad de mi mami que hasta el día de hoy ha sido el momento más difícil que hemos tenido que vivir.

A mis amigos Jean Pierre M., Evelyn Mishell R., Nicole J., Sergio G., Silvana R., Josselyn E., Raquel A., Massiel Z., por su amistad y compañía durante toda la carrera que tuvimos el gusto de encontrarnos. Por las lindas experiencias que creamos en cada viaje al que fuimos juntos. Gracias por haber estado en mis momentos más difíciles, que es cuando uno más los necesita.

Contenido

Hojas de Resultados de la Herramienta Copyleaks	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Tablas.....	12
Índice de Figuras	13
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Formulación del problema	18
Justificación del problema.....	19
Objetivos de la Investigación	20
<i>Objetivo General</i>	20
<i>Objetivos Específicos</i>	20
Capitulo II: Marco Referencial	22
Banano	22
<i>Taxonomía</i>	22
<i>Clasificación</i>	22
<i>Enfermedades</i>	25

	10
Fusarium oxysporum f.sp. cubense.....	25
<i>Taxonomía</i>	25
<i>Clasificación</i>	26
<i>Morfología</i>	27
<i>Medios y Mecanismo de Dispersión de Fusarium en el Banano</i>	28
<i>Patogenia</i>	29
<i>Diagnóstico</i>	30
<i>Control</i>	30
Gen Candidato Resistente.....	31
<i>Gen RGA2</i>	31
Detección de Genes Candidatos	32
Análisis de Expresión Génica	33
qPCR.....	34
<i>SYBER Green</i>	35
<i>Análisis de Datos qPCR</i>	36
<i>Cuantificación Absoluta</i>	37
<i>Cuantificación Relativa</i>	37
Hipótesis.....	40
Capitulo III: Materiales y métodos	41
Instituciones Participantes	41
Colaboradores Científicos.....	41
Zona de Estudio	41
Material Biológico.....	41

Extracción de ARN.....	45
<i>E.Z.N.A Plant RNA Kit</i>	46
<i>Método CTAB modificado</i>	47
Análisis de Cantidad y Calidad de ARN	48
Preparación de ADNc (Transcripción Inversa)	48
Desarrollo de Ensayos de qPCR	49
Análisis de Datos de qPCR.....	52
Capítulo VI: Resultados	53
Extracción de ARN.....	53
Preparación de ADNc (transcripción inversa)	56
Ensayos de qPCR.....	58
Análisis de Datos qPCR.....	65
Capítulo V: Discusión	68
Conclusiones.....	72
Recomendaciones	73
Bibliografía.....	74

Índice de Tablas

Tabla 1.	Respuesta de clones del germoplasma de banano, plátano y Heliconia spp. a las razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. cubense. hasta ahora identificadas.....	27
Tabla 2.	Valores C_T necesarios para la cuantificación relativa con el gen de referencia como normalizador.	39
Tabla 3.	Métodos de cuantificación usando un gen de referencia	39
Tabla 4.	Genotipos y respuesta a Foc R4T de las accesiones de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP	41
Tabla 5.	Componentes iniciales.	48
Tabla 6.	Master mix para la síntesis de ADNc a partir del ARN molde.....	49
Tabla 7.	Secuencias de los cebadores RGA2, TUBB, ACT3 y longitud del producto esperado durante la amplificación.....	50
Tabla 8.	Configuración de reacciones PCR.	50
Tabla 9.	Condiciones de ciclo térmico de PCR.....	51
Tabla 10.	Condiciones de la curva de disociación (etapa de la curva de fusión).	51
Tabla 11.	Cantidad y Calidad de ARN obtenido	53
Tabla 12.	Cantidad y calidad de ADNc obtenido.	56
Tabla 13.	Cantidad y calidad de ADNc diluido (~100 ng/ μ L) obtenido.....	57
Tabla 14.	Cantidad y calidad de ADNc diluido (~10 ng/ μ L) obtenido.....	58
Tabla 15.	Valores C_t obtenidos para cada una de las muestras de tejido foliar.	60
Tabla 16.	Valores C_t obtenidos para cada una de las muestras de raíz.....	63

Índice de Figuras

Figura 1. Representación de la evolución y domesticación del banano.....	23
Figura 2. Morfología de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	28
Figura 3. Síntomas externos e internos de la enfermedad de marchitez por <i>Fusarium</i>	29
Figura 4. Flujo de trabajo para análisis de expresión génica	34
Figura 5. SYBER Green en ensayos de qPCR.....	35
Figura 6. Gráfico de Amplificación.....	36
Figura 7. Accesiones de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP.	42
Figura 8. Muestras de hojas de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP ..	44
Figura 9. Muestras de raíz de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP.....	45
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN de tejido foliar de las diferentes accesiones de banano.....	55
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN de raíces de las diferentes accesiones de banano.....	56
Figura 12. Distribución del ensayo qPCR para las muestras de tejido foliar con los genes TUBB, ACT3 y RGA2.	59
Figura 13. Gráfica de amplificación de las muestras de tejido foliar con los genes RGA2, TUBB, ACT3.	59
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de qPCR de las muestras de tejido foliar con el gen β -tubulina.....	61
Figura 15. Distribución del ensayo qPCR para las muestras de raíz con los genes TUBB, ACT y RGA2.	62
Figura 16. Gráfica de amplificación de las muestras de raíces con los genes RGA2, TUBB, ACT3.....	63

- Figura 17.** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de qPCR de las muestras de raíz con el gen actina.....65
- Figura 18.** Gráfico de barras del análisis de expresión génica del gen RGA2 en tejido foliar de las diferentes accesiones banano.66
- Figura 19.** Gráfico de barras del análisis de expresión génica del gen RGA2 en raíz de las diferentes accesiones banano.....67

Lista de Abreviaciones

ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
Foc	<i>Fusarium oxysporum cubense</i>
Foc R1	<i>Fusarium oxysporum cubense</i> raza 1
Foc R2	<i>Fusarium oxysporum cubense</i> raza 2
Foc R4T	<i>Fusarium oxysporum cubense</i> raza 4 tropical
Foc R4ST	<i>Fusarium oxysporum cubense</i> raza 4 subtropical
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RGA2	Gen de resistencia análogo 2
TUBB	β -tubulina
ACT3	Actina
FHIA	Fundación Hondureña de Investigación Agropecuaria

Resumen

Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* (Foc) causante del marchitamiento por *Fusarium* (Mal de Panamá) es una de las patologías que más afectan a las musáceas. A mediados de 1990, la nomenclatura de *Fusarium* basado en las razas se definió por su grado de patogenicidad sobre diferentes accesiones de banano. Foc raza 1 fue reportada en Australia (1870), donde se piensa co-evolucionó mucho antes con el banano. En la región Latinoamericana y el Caribe después de la incidencia de Foc R1 y R2 se han adoptado algunos métodos de prevención. La nueva raza Foc R4T ha generado una gran alerta en los veinte países productores de banano, siendo uno de ellos Ecuador. Debido al grado de destrucción que ocasiona y a su nivel de supervivencia, Foc R4T se ha convertido en un patógeno de gran importancia económica y científica. La mejor solución a Foc R4T son los cultivares resistentes. El objetivo de la investigación fue evaluar la expresión del gen RGA2 de banano, asociado a la resistencia a Foc R4T, en accesiones del Banco de Germoplasma de Banano de la EETP-INIAP. Se utilizaron 2 métodos de extracción de ARN en las accesiones de banano: CMP-001 (AA), CMP-008 (AAA), CMP-025 (AA), CMP-040 (AAAB) y CMP-041 (AAAA). Las accesiones Orito, Ortaete 51 y *Musa acuminata* son susceptibles a Foc R4T, mientras que FHIA-01 y FHIA-02 son tolerantes. La extracción CTAB modificado tuvo mejores resultados sobre las muestras de tejido foliar y raíces. El análisis de expresión génica reveló diferencias de expresión del gen RGA2 a nivel foliar pero no a nivel de raíz. Siendo la accesión CMP-040 (FHIA-01) con el nivel más alto de expresión del gen RGA2: la accesión CMP-001 (Orito) se expresa 2 veces menos, la accesión CMP-008 y CMP-025 (Ortaete 51 y *Musa acuminata*, respectivamente) se expresa 3 veces menos y la accesión CMP-041 (FHIA-02) se expresa 10 veces menos, siendo esta accesión con el menor nivel de expresión del gen RGA2. Se observó una correlación entre los niveles de expresión de RGA2 y la tolerancia a Foc R4T reportada para las diferentes accesiones analizadas.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum cubense*, gen de resistencia análogo 2, banano, qPCR, cuantificación relativa.

Abstract

Fusarium oxysporum f.sp. *cabense* (Foc), which causes Fusarium wilt (Panama disease), is one of the pathologies that most affects Musaceae. In the mid-1990s, the race-based nomenclature of Fusarium was defined by its degree of pathogenicity on different banana accessions. Foc race 1 was reported from Australia (1870), where it is thought to have co-evolved much earlier with plantain. In the Latin American and Caribbean region, after the incidence of Foc R1 and R2, some prevention methods have been adopted. The new Foc R4T breed has generated a great alert in the twenty banana-producing countries, one of them being Ecuador. Due to the degree of destruction, it causes and its level of survival, Foc R4T has become a pathogen of great economic and scientific importance. The best solution to Foc R4T are resistant cultivars. The objective of the research was to evaluate the expression of the banana RGA2 gene, associated with resistance to Foc R4T, in accessions from the Banana Germplasm Bank of the EETP-INIAP. Two RNA extraction methods were used in the banana accessions: CMP-001 (AA), CMP-008 (AAA), CMP-025 (AA), CMP-040 (AAAB) and CMP-041 (AAAA). The Orito, Ortaete 51 and *Musa acuminata* accessions are susceptible to Foc R4T, while FHIA-01 and FHIA-02 are tolerant. The modified CTAB extraction had better results on leaf and root tissue samples. Gene expression analysis revealed differences in the expression of the RGA2 gene at the foliar level but not at the root level. Being the accession CMP-040 (FHIA-01) which presents the highest level of expression of the RGA2 gene: the accession CMP-001 (Orito) expresses 2 times less, the accession CMP-008 and CMP-025 (Ortaete 51 and *Musa acuminata*, respectively) is expressed 3 times less and accession CMP-041 (FHIA-02) is expressed 10 times less, this accession having the lowest level of expression of the RGA2 gene. An evaluation will be verified between the expression levels of RGA2 and the tolerance to Foc R4T reported for the different accessions analyzed.

Keywords: *Fusarium oxysporum cabense*, analogue resistance gene 2, banana, qPCR, relative quantification.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Actualmente, podemos encontrar ciertas patologías que afectan a las musáceas tal como *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. La presencia de estas enfermedades nos hace optar por alternativas que sean mejor para este tratamiento. Una opción factible es el estudio de nuevos cultivos que sean resistentes. Para ello es necesario realizar investigaciones de bioinformática sobre la búsqueda de genes que sean resistentes a esta patología seguido de ensayos moleculares que nos ayuden verificar la expresión de dichos genes.

En la región de América Latina y el Caribe, después de la presencia de Foc R1 y R2 se ha cultivado clones susceptibles como medida inicial de manejo. Sin embargo, por el mal manejo de la enfermedad y la naturaleza del hongo, la siembra solo se puede dar en periodos cortos (Pocasangre et al., 2009). Según Martínez Solorzano et al., 2020, se ha presentado metodologías para el tratamiento y/o prevención de este patógeno como: herramientas de diagnóstico a Foc R4T, control del cultivo con sospecha de infección, plántulas *in vitro* y la búsqueda de clones resistentes o tolerantes a Foc. Todas estas opciones podrían ayudarnos con el manejo de la enfermedad causada por dicho hongo. Se ha generado controversia, ya que la nueva raza de Foc (Foc R4) está afectando a clones Cavendish. Su propagación es rápida y ya se ha presentado en diferentes países de los cuales 135 son productores de banano. Esto ha generado gran preocupación a nivel mundial específicamente en la región LAC (FAO, 2017).

El 26 de junio de 2019, se notificó que en Colombia gracias a ciertas medidas de contención y erradicación se ha logrado controlar el primer brote de Foc R4T. Ecuador, Panamá y Venezuela al ser países vecinos de Colombia, se ha generado cierta preocupación por la posible aparición de este brote de Foc R4T (AUGURA, 2019).

Por el momento no existen cultivares comerciales resistentes en el Ecuador. Esto ha generado que como medida de contención se cree una Red de Laboratorios de diagnóstico de Foc R4T. Los laboratorios cuentan con tecnología de punta para asegurar un correcto diagnóstico de Foc R4T a través de PCR convencional y PCR en tiempo real (AGROCALIDAD, 2021). Sin embargo, únicamente son métodos de diagnóstico, si *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* llegase a alguna finca bananera especialmente raza 4, se generará una gran epidemia ocasionando grandes pérdidas en los cultivos y un gran déficit económico para el país.

Justificación del problema

Fusarium oxysporum, es una especie de hongo de gran importancia económica-científica en el campo de la fitopatología, ciertas cepas de este hongo son causantes de la fusariosis (Mal de Panamá) siendo esta patología la causante de muchas enfermedades y de pudrición en los pseudotallos en banano puede ocasionar una gran destrucción de los cultivos (Summerell, 2019). Al poder sobrevivir de tejido en descomposición y materia orgánica en el suelo, este organismo resulta imposible eliminarlo del hospedero (Magdama, 2019). Ocasionando que la fumigación sea una opción de saneamiento deficiente.

Según la Corporación Financiera Nacional (2021), en el 2020 se vio una pérdida de banano por Foc raza 1 de un 9%, mientras que la superficie cosechada tuvo una disminución de 12% comparado al año 2019. En el año del 2020, la producción de banano en el Ecuador estuvo cerca de 6,023.4 mil toneladas (Tm). Según cifras de la Asociación de Exportadores de Banano del Ecuador (2022), la exportación de este cultivo alcanzó en 2020 y 2021 el nivel de 386 y 376 millones de cajas, respectivamente. La importación de banano al Ecuador es mínima, ya que al ser unos de los principales productores de banano en el mundo también es considerado uno de los principales exportadores de este producto. (Corporación Financiera Nacional, 2021).

Tal como se mencionó anteriormente, no existen reportes de genes de avirulencia o resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en nuestro país. En un estudio realizado

por Li et al., 2013, se logró identificar toxinas de ácido fusárico y bovericina, las cuales cumplen un rol importante en frutos de banano infectados con Foc R1 y Foc R4T. Siendo así limitado el conocimiento de la interacción *Foc-Musa* spp (Portal González et al., 2017).

El estudio de genes candidatos resistentes es de gran importancia, ya que cada uno de ellos cumple un rol importante en los mecanismos de defensa contra Foc. Un ejemplo de ello son los genes de avirulencia los cuales están presentes en los genomas del banano. Siempre y cuando se posea el gen de resistencia, el hospedante puede detectar esa patología evitando el desarrollo de la enfermedad. Las plantas al tener proteínas de resistencia pueden reconocer moléculas efectoras de patógenos desencadenando cierta inmunidad (Portal González et al., 2017). La evaluación de la expresión de genes candidatos resistentes a *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* presentes en las musáceas nos da un indicio del desarrollo de nuevos cultivares resistentes. Es por ello que es un gran aporte conocimiento científico, saber cómo el gen RGA2 de banano se asocia a la resistencia a Foc mediante el análisis de expresión génica en diferentes accesiones de banano.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la expresión del gen RGA2 de banano asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* presente en el Banco de Germoplasma de Banano de la EETP- INIAP.

Objetivos Específicos

- Identificar el mejor método para la obtención de ARN de buena calidad a partir de diferentes muestras de banano.
- Analizar la expresión de genes de mantenimiento como controles internos para qPCR.

- Cuantificar la expresión del gen RGA2 de banano resistente a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* mediante qPCR del Banco de Germoplasma de Banano de la EETP- INIAP.

Capítulo II: Marco Referencial

Banano

Taxonomía

Los bananos son hierbas gigantes y no árboles, carecen de tallo y pueden llegar a medir hasta 3 m de altura. Toda la diversidad del banano está comprendida por el género taxonómico *Musa*, el cual fue desarrollado por Carl Linneo. Los bananos dulces (Ej.: Cavendish, Gros Michel) tienen el nombre binomial latino *Musa sapientum* mientras que los plátanos (Bananos de cocina) se les conoce como *Musa paradisiaca* (Cheesman, 1948). En la familia Musaceae se encuentran los bananos (incluyendo plátanos). *Musa* también incluye el género asiático y africano *Ensete* (Perrier et al., 2011).

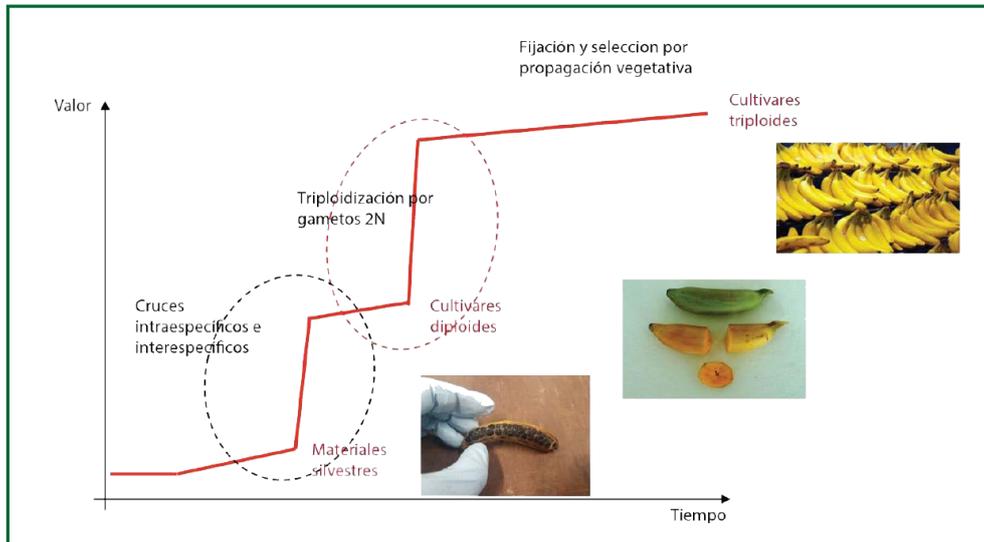
Clasificación

Tal y como señala D'Hont et al., 2000, existe 4 genomas de banano conocidos que están representados con A, B, S y T haciendo referencia a las especies silvestres de la sección *Eumusa* (actualmente *Musa*): *Musa acuminata*, *M. balbisiana*, *M. schizocarpa* y *M. australimusa*, respectivamente. Existen 2 ancestros diploides: *M. acuminata* (genoma-AA) y *M. balbisiana* (genoma-BB). El cruce de estos 2 bananos diploides ayudo a originar casi todos los bananos y plátanos comestibles, los cuales pertenecen al género *Musa* considerándose, así como híbridos domesticados por el hombre (García Bastidas et al., 2020).

Las múltiples hibridaciones espontáneas entre varias especies y subespecies de banano han ayudado en el proceso de domesticación. El aborto espontáneo de semillas, la selección de varios diploides y triploides junto con partenocarpia también jugo un papel importante en la propagación vegetativa del banano (D'Hont et al., 2012) (Figura 1).

Figura 1.

Representación de la evolución y domesticación del banano



Nota. Adaptado de “Advances in genomics: applications to banana breeding” (p. 173), por F. Bakry & J.P. Horry, 2014, *ISHS Acta Horticulturae 1114*.

Un conjunto de germoplasma comestible con genomas AA, BB, AB, AAA, AAB y ABB fueron proporcionadas por medio de la anterior mencionada domesticación de banano. Todos los genomas antes señalados pertenecen a la familia taxonómica de las Musáceas (D’Hont et al., 2000). Además, 180 parientes silvestres y al menos 50 tetraploides han sido desarrollados vía mejoramiento genético y están disponibles en colecciones vivas o como muestras criopreservadas en bancos de germoplasma (García Bastidas *et al.*, 2020). A continuación, se presenta información sobre algunos de los genomas que se va a tratar en la presente investigación:

Orito (AA). Conocido también por su nombre científico como *Musa acuminata*. Según Soto (1990), este tipo de banano presenta un pseudotallo de color amarillo verdoso, el mismo que presenta ciertas manchas oscuras y la altura de este banano esta entre 2,5 y 4 metros. Este tipo de banano presenta un genoma AA, es decir es diploide, debido a su altura y a su eficaz sistema radicular es resistente a fuertes vientos. Además, tienen un alto

contenido de vitaminas haciéndolo diferente a otros tipos de banano (Cedeño , 2010). En un estudio realizado por Chen et al., 2019, se trabaja con algunas accesiones de banano que son diploides (AA), dando como resultado resistencia a Foc-R4T.

Musa acuminata (AA). Este cultivo es originario de Australasia. Este tipo de banano es diploide, con $2n=22$. Al ser un ancestro que presenta el genoma AA ha ayudado a generar ciertos cultivos como lo son los triploides, en este caso su genoma será AAA. Es considerada como una hierba de gran altura, alcanzado alrededor de los 7 m. Además, presenta una estructura denominada pseudotallo (Cheesman, 1948) . En la investigación realizada por Peraza-Echeverria et al., 2008, se ha demostrado que el gen RGA2 aislado de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* confiere resistencia a R4T en ensayos de campo realizados en Australia.

Ortaete 51 (AAA, AAB, ABB). Los bananos triploides son responsables de casi el 75% de producción mundial de banano. Aunque, el Mal de Panamá afecto a una gran cantidad de cultivos triploides, como medida se optó por el desarrollo de cultivares resistentes del subgrupo Cavendish (AA) Tal situación obligó a la industria bananera a desplegar cultivares resistentes del subgrupo Cavendish (AAA), no obstante, este cultivo es solo resistente a Foc R1. Aun la mayoría de cultivos triploides sigue siendo susceptible a Foc R4T (García-Bastidas et al., 2022).

FHIA-01 (AAAB). La Fundación Hondureña de Investigación agrícola (FHIA) generó este cultivo en 1988 con el fin de obtener bananos con mayor tolerancia a ciertas enfermedades. Algunas de las características de este tipo de cultivo es que su crecimiento es hasta alrededor de 2,5 m de altura, tienen un pseudotallo de color verde y con ciertas manchas marrones. Una de las características que presentan ciertos cultivos tolerantes/resistentes a Foc, es que sus hojas en el invierno permanecen bastante verdes. Frente a las diferentes razas de Foc, FHIA-01 es susceptible, altamente tolerante y resistente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1, 2 y 4 (ProMusa, 2020). En presencia de otro tipo de patologías, este híbrido es resistente a Sigatoka negra, es

moderadamente resistente al nemátodo *Radopholus similis* y moderadamente susceptible a *Pratylenchus coffeae* (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola , 2023).

FHIA-02 (AAAA). El cultivo híbrido FHIA-02 fue desarrollado por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) con el fin de ser resistente a la raya negra de la hoja. A diferencia de los otros cultivares de banano, este presenta un pseudotallo rojizo con pocas manchas. En un estudio realizado en Australia, frente a Foc R1 y R4 este cultivar es susceptible y sensible respectivamente (ProMusa, 2017). En presencia de Foc R2, este cultivo no ha presentado síntomas o solo se observa ligera clorosis (Ploetz & Pegg, 1999). En la investigación realizada por Chen et al., 2019, FHIA-02, se considera como extremadamente susceptible a Foc-SR4T. Así mismo fueron evaluadas los rizomas de FHIA-02 presentando resistencia a Foc-R4T.

Enfermedades

Entre las enfermedades fúngicas que se presentan en los cultivos de banano se encuentra la Sigatoka amarilla y negra las cuales son producidas por *Mycosphaerella musae* y *M. fijiensis* respectivamente. La patología que nos interesa, el marchitamiento por *Fusarium* (Mal de Panamá) es producida por una gran variedad de especies del género *Fusarium* spp (Maryani et al., 2019). Mozo Sánchez et al., 2014, presenta otras enfermedades bacterianas, fúngicas y víricas que pueden afectar a este cultivo, tal como: Moko del plátano (*Ralstonia solanacearum*), marchitez bacteriana del plátano (*Xanthomonas campestris* pv. *musareum*), virus del bunchy top (BTV), virus del mosaico de la bráctea (BBrMV), virus del estriado del plátano (BSV) y virus del mosaico del plátano (BMV)

Fusarium oxysporum f.sp. cubense

Taxonomía

Sinónimos:

- *Fusarium cubense*

- *Fusarium* var. *cubense*
- *Fusarium cubense* var. *inodoratum*

Posición taxonómica:

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Filum: Ascomycota

Subfilum: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum cubense*

(CABI, 2021)

Clasificación

Las diferentes razas que presentan Foc sobre banano están en función de su patogenicidad, de las cuales en la actualidad se han encontrado 4, tal como se señala en la tabla 1. Foc R1 resulta patogénica para 'Gros Michel' (AAA), banano 'seda/silk' (AAB), 'Pisang awak' (ABB), 'Abaca' (AA), 'Maqueño' (AAB) y 'Pome' (AAB). Por otro lado, Foc R2 resulta compatible con ciertos genotipos como: Bluggoe (ABB), algunos genotipos tetraploides y Ensete (Waite & Stover, 1960). La raza 3, en este caso no afecta a musáceas, razón por la cual ya no se considera parte del esquema de *Fusarium* spp. que resulta patógeno para el banano (Ploetz, 2006). Los genotipos de Cavendish suelen ser afectados por Foc R4 ocasionando grandes pérdidas del rendimiento del cultivo (Ploetz R. ,

2005). Recientemente, se ha identificado una nueva raza que ha generado gran preocupación a la cual la denominaron *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense raza 4 tropical (Foc R4T). Así mismo, existe una variante más leve que se presentó en los subtropicales después de un estrés abiótico, esta variante es denominada (Foc R4ST) (García Bastidas et al., 2020).

Tabla 1.

Respuesta de clones del germoplasma de banano, plátano y Heliconia spp. a las razas de Fusarium oxysporum f.sp. cubense. hasta ahora identificadas.

Cultivar		Respuesta a Foc			
Cultivar/accesión	ITC code	Raza 1	Raza 2	Raza 3	Raza 4
Gross Michel (AAA)	ITC1122	S	R	R	S
Bluggoe (ABB)	ITC0643	R	S	R	ND
Cavendish (AAA)	ITC0365	R	R	R	S
<i>Heliconia</i> spp.	NA	R	R	S	ND

Nota. International Transit Center (ITC), Bioversity International; S: Susceptible; R:

Resistente; ND: No definido. Adaptado de Orjeda , 1998

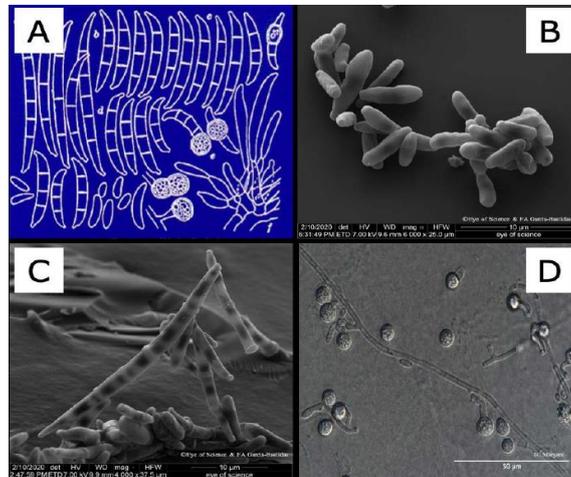
Morfología

Según Monzón & Rodríguez Tudela (2000), Foc presenta una gran variedad morfológica y con el paso del tiempo ha sufrido diferentes mutaciones en cultivo. Foc suele presentar un micelio abundante, disperso, de color blanco, velloso. En medios de cultivo suele producir pigmentos que van de color rojo oscuro a violeta pálido. Respecto a su morfología estructural, los macroconidios suelen ser de 27-55 μm de largo y 3.3-5.5 μm de ancho, estos tienen forma de hoz, a veces suelen ser rectos y con paredes delgadas. Por otro lado, los microconidios suelen medir entre 6-16 μm de largo y 2.4-3.5 μm de ancho, además no presentan septos. La morfología de los microconidios suele ser ovalada, elíptica o reniforme. Finalmente se encuentran las clamidosporas, las cuales pueden llegar a medir 7-11 μm de diámetro y estas suelen formarse de manera aislada o en cadenas sobre las hifas o conidios (SENASICA, 2018). Para la clasificación de diversas especies, ciertos taxónomos utilizaban bases morfológicas teniendo en cuenta incluso la forma de los

macroconidios (Figura 2), esta técnica se volvió más difícil ya que en su mayoría los conidios resultan indistinguibles (Domsch, Gams, & Anderson, 1980).

Figura 2.

Morfología de Fusarium oxysporum f.sp. cubense.



Nota. A) Caracteres morfológicos de los propágulos del hongo de la enfermedad de Panamá (B) microconidios (C) macroconidios (D) clamidosporas. Adaptado de *Guía Andina para el Diagnóstico de Fusarium Raza 4 Tropical (R4T)* (p. 20), por García Bastidas *et al.*, 2020, Comunidad Andina.

Medios y Mecanismo de Dispersión de Fusarium en el Banano

Stover & Ploez (1990), afirman que las principales vías por las cuales se moviliza el patógeno Foc en grandes monocultivos suele ser: agua contaminada, material vegetal infectado, herramientas y/o maquinaria que hayan estado en contacto con el hongo y suelo infestado por Foc.

El proceso de infección suele comenzar cuando las hifas fúngicas invaden las raíces de los cultivos de banano. Evidentemente, afecta a los cultivos susceptibles ingresando por las raíces y causando una oclusión de los vasos del xilema. La oclusión suele darse ya que la planta forma geles y tiloides para restringir la expansión del hongo y evitar el colapso celular (Ghag *et al.*, 2015). Li *et al.*, 2012, señalan que la infección por Foc R4T suele

generar decoloración marrón rojiza en rizomas y los vasos vasculares que se encuentran en el pseudotallo.

Patogenia

Se puede observar una marchitez progresiva como síntoma externo. Esta marchitez va desde tejido foliar de color amarillo que posteriormente colapsa alrededor del pseudotallo seguido de un ocasional agrietamiento. El problema persiste, ya que este patógeno produce unas clamidosporas que contaminan los suelos durante una gran cantidad de tiempo (Ploetz R. , 2006).

Figura 3.

Síntomas externos e internos de la enfermedad de marchitez por Fusarium.



Nota. A) Síntomas externos con un extenso amarillamiento foliar, así como también el colapso de las hojas alrededor del pseudotallo y agrietamiento del pseudotallo; (B-C) síntomas internos mostrando el enrojecimiento de los haces vasculares en el pseudotallo y el cormo. Adaptado de *Guía Andina para el Diagnóstico de Fusarium Raza 4 Tropical (R4T)* (p. 17), por García Bastidas et al., 2020, Comunidad Andina.

Diagnóstico

Según el COE Nacional (2020), la capacitación del personal de campo para la identificación de síntomas de Foc R4T y como se debe actuar es fundamental para el diagnóstico de esta patología. El personal de campo juega un papel importante ya que son ellos quienes tienen acceso al cultivo, pudiendo recorrer todas las instalaciones de las fincas y detectar plantas sospechosas con Foc R4T.

En caso de sospecha de Foc R4T, el plan de contingencia por el que se ha optado es la confirmación de un resultado positivo para el diagnóstico de dicha patología mediante procedimientos como:

- a) Extracción de ADN, PCR
- b) PCR tiempo real según Aguayo et al., 2017.
- c) PCR convencional según Li et al., 2013.

Control

La mejor estrategia ante esta sintomatología, es la implementación de medidas fitosanitarias de prevención sobre el área sospechosa. Se debe buscar la forma de establecer el área bajo cuarentena para poder implementar medidas de contención, supresión y erradicación dependiendo de cómo ha ido evolucionando los primeros brotes de la enfermedad (COE Nacional, 2020).

Según el COE Nacional (2020), el control y/o manejo de un brote de Foc R4T es diferente ya que contempla diferentes distancias de delimitación en zonas establecidas. Se debe tomar en cuenta inclusive los tiempos y productos que se deben aplicar. Algunas de las medidas Fito y zoonosanitarias que se suelen usar son:

- Observar el cultivo constantemente con el fin de detectar plantas con sintomatología.
- Evitar movilizar el material de siembra de plantas afectadas (colinos, rebrotes o hijos).

- Desinfectar las herramientas constantemente con ayuda de la aplicación de amonio cuaternario de cuarta o quinta generación.
- No movilizar plantas enfermas, ni desecharlas en canales de riego y drenaje.
- Asistir a capacitaciones y estar constantemente informado (COE Nacional, 2020).

Gen Candidato Resistente

Un gen candidato resistente (genes R) es aquel que se encuentra en el genoma de un cultivo. Dichos genes producen resistencia a ciertas enfermedades (patógenos) por medio de la producción de proteínas R. En el momento que esta proteína R detectó la presencia de la enfermedad, el mismo cultivo puede generar una defensa contra dicho patógeno. Es así que, los genes R se han convertido en genes de gran interés ya que participan en gran parte de la inmunidad requerida por ciertos patosistemas agrícolas (Arora et al., 2019).

Gen RGA2

En un estudio realizado por Dale et al., 2017 se habla sobre una línea de banano transgénica transformada con RGA2 que permanece libre de enfermedades. Debido a que Foc R4T se suele transmitir a través de las raíces, resulta importante investigar la base de la resistencia analizando en un principio el tejido radicular, para así evaluar la expresión del RGA2. Al ser RGA2 el transgén más adecuado para la desregulación resulta importante realizar el análisis cuantitativo únicamente sobre las líneas de RGA2. Este estudio nos permitió visualizar una fuerte correlación entre el nivel de expresión de RGA2 y el nivel de protección contra R4T. (Dale et al., 2017).

En otra investigación realizada por Peraza-Echeverría et al. (2008) se evaluó la expresión de los análogos de genes de resistencia (RGA) mediante RT-PCR en tejidos de hojas y raíces de banano. La expresión de RGA2 solo se observó en cultivos con resistencia a Foc R4T. Además, en esta investigación se puede observar cómo RGA2 es

una proteína de resistencia a enfermedades de plantas que está involucrada en la resistencia a R4T en varias accesiones de banano (Peraza-Echeverria et al., 2008).

Detección de Genes Candidatos

Existen diferentes métodos moleculares para la detección e identificación de genes que colaboren a la susceptibilidad o resistencia en enfermedades. Silva (2004), señala ciertos métodos para la detección de genes: estudios de rastreo sistemático del genoma con análisis de ligamiento, los análisis de asociación en casos y controles, y el test de desequilibrio de transmisión (TDT) en familias. La metodología anteriormente mencionada, se basa en que las características funcionales de la proteína codificada por estos genes pudieran estar implicadas de alguna manera en la patogénesis de la enfermedad.

Otro método también es la técnica cDNA-AFLP diferencial para detectar genes candidatos relacionados con la respuesta a estreses abióticos y bióticos. Esta técnica nos permite detectar fragmentos de restricción de ADN a través de ensayos PCR. Una ventaja es que no requiere información de la secuencia, haciéndolo excelente para la identificación de nuevos genes (Ritter et al., 2020). Las herramientas *in silico* también han sido un gran aporte, DigiCGA es uno de ellos, denominado también como enfoque de gen candidato facilitado por computadora. El enfoque de esta técnica se basa en extraer, filtrar, (re)ensamblar o (re)analizar los posibles recursos que se encuentren disponibles de las bases de datos web públicas, respetando los principios de la ontología biológica y métodos estadísticos que nos permitan identificar mediante computadora los genes candidatos que sean de nuestro interés (Zhu & Zhao, 2007).

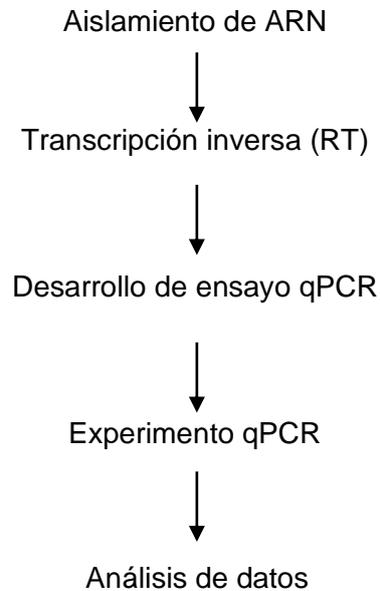
En un estudio realizado por Li et al., 2019, el pronto desarrollo de la secuenciación de alto rendimiento, ha generado varias tecnologías como RNA-seq, siendo utilizado para el desarrollo de marcadores moleculares, la detección del patrón de expresión y el nivel de respuesta de los genes a los patógenos. Además de permitirnos identificar diversos genes, es útil también para tener un cierto entendimiento de la función de los genes sin información previa de las secuencias del genoma. Razón por la cual, RNA-seq nos permite explorar

genes resistentes a enfermedades. La utilización de microarreglos y técnicas de proteómica resulta importante para identificar nuevos genes candidatos permitiéndonos tener un cierto entendimiento de la base genética de la resistencia a enfermedades infecciosas, en este caso el genoma de las plantas ya debe estar secuenciado para su análisis (Savedra Gallo, 2012).

En la investigación previa realizada en la EETP-INIAP se diseñó una metodología bioinformática alternativa para identificar genes de resistencia contra Foc R4T. Con el objetivo de encontrar secuencias genéticas dentro de los cultivos de banano que estén involucrados en ciertos mecanismos de defensa, se hizo una búsqueda utilizando base de datos biológicas y artículos científicos relacionados a análisis transcriptómicos. La base de datos "Nucleotide" de NCBI, sirvió para buscar genes reportados como resistentes contra *Fusarium* sp, esto se hizo mediante un comando de búsqueda con operadores booleanos y avanzados. Los artículos científicos analizados tienen información sobre la evaluación del efecto de Foc R4T en banano mediante análisis transcripcionales. *M. acuminata* (Genoma A) y *M. balbisiana* (Genoma B) fueron utilizados como genomas de referencia para la búsqueda de genes que sean resistentes a *Fusarium* sp., los genomas de referencia se obtuvieron mediante Banana Genome Hub. Al final se obtuvo un compendio de datos (3 listas) sobre posibles genes resistentes. Todos estos datos fueron sometidos a un filtro, el cual consistía en tener al menos un gen de resistencia validado experimentalmente (RGA2 y RGA5). Al término de esta investigación, se identificaron nueve genes candidatos asociados a la resistencia contra FOC R4T presentes en el genoma de banano: PR1, CHS, RIN4, RPM1, RPS2, WRKY22, NPR1, TGA4 y PAL (León Alcívar, 2022). Es así que, en la presente investigación se plantea evaluar el gen RGA2 como punto de partida, mediante análisis de expresión génica ya se considera resistente por fuentes bibliográficas y cuenta con validación experimental.

Análisis de Expresión Génica

Para el análisis de expresión génica usualmente se usa el siguiente flujo de trabajo

Figura 4.*Flujo de trabajo para análisis de expresión génica*

Nota. Adaptado de *Real Time PCR-Applications Guide* (p. 51), por BIO-RAD Laboratories, 2006.

qPCR

BIO-RAD Laboratories (2006), señala que la qPCR (PCR cuantitativa) o en tiempo real es una variante de la PCR convencional. Sin embargo, es utilizada para para amplificar y cuantificar simultáneamente de forma absoluta el producto de amplificación del ADN. Al igual que una PCR punto final, la qPCR emplea un molde de ADN, un par de primers específicos, dNTPs, tampón de reacción adecuado y una polimerasa termoestable. La gran diferencia es que, en la qPCR se añade una sustancia marcada con un fluoróforo, la cual nos ayuda a medir la generación de uno o más productos específicos en el termociclador que cuenta con sensores de fluorescencia, generándonos un resultado tras excitar el fluoróforo a una longitud de onda adecuada (Watson et al., 2004). En otras palabras, detecta y mide la acumulación de producto amplificado a medida que avanza la reacción (en tiempo real). Lo que usualmente se usa en estos ensayos son tintes de unión a ADN y cebadores (SYBR Green) o sondas específicas de secuencia marcadas con fluorescencia.

Esta fluorescencia medida es proporcional a la cantidad de producto amplificado en cada ciclo (BIO-RAD Laboratories, 2006).

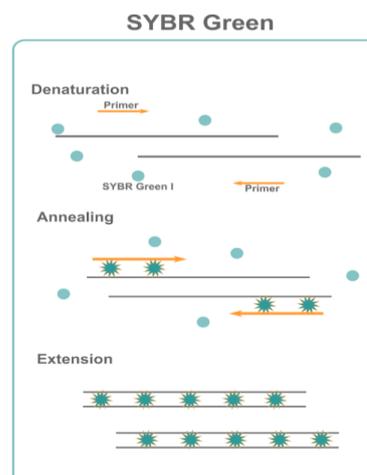
SYBER Green

Según Mészáros (2022), una qPCR con SYBR Green cuenta con las mismas fases que una PCR convencional: desnaturalización, hibridación y extensión. La diferencia es que se utiliza un colorante (SYBR Green) de unión al ADN de doble cadena. Durante la fase de extensión, el tinte fluorescente se intercala en las secuencias de ADN de doble cadena, es aquí donde se visualiza un gran aumento de la señal fluorescente (Figura 5). Al final de cada ciclo, la medición de esta señal nos ayuda a determinar la cantidad de ADN presente.

La ventaja de SYBR Green es que, debido a que se une a todo el ADN de doble cadena, no requiere sondas específicas, lo que puede ayudar a reducir los costos. Es un método único ideal para los investigadores que realizan experimentos de análisis de expresión génica (Behind The Bench Staff, 2022). La desventaja del ensayo SYBR Green es que el tinte se une a cualquier secuencia de ADN de doble cadena. Esto significa que también podría detectar la fluorescencia emitida por productos de qPCR no específicos, como los dímeros de cebadores (Mészáros, 2022).

Figura 5.

SYBER Green en ensayos de qPCR



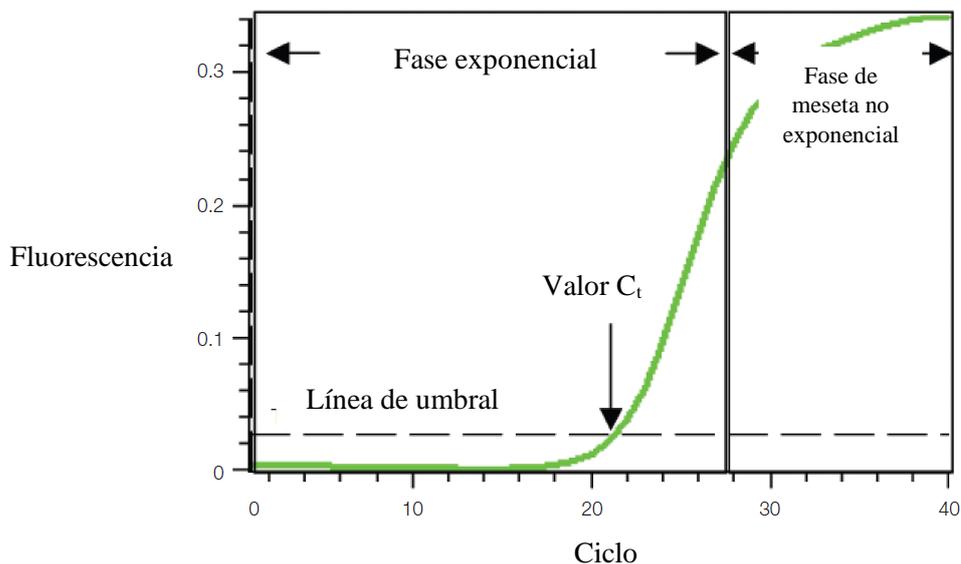
Nota. El gráfico representa como el tinte fluorescente SYBER Green actúa sobre las secuencias de ADN de doble cadena. Tomado de qPCR: How SYBR® Green and TaqMan® real-time PCR assays work, por Éva Mészáros, 2022, INTEGRA (<https://www.integrabiosciences.com/>).

Análisis de Datos qPCR

En la Figura 6, se muestra la gráfica de amplificación que se debe analizar en los ensayos de qPCR. En el eje X, se muestra el número de ciclos de la PCR. Mientras que en el eje Y se indica la fluorescencia de la reacción de amplificación la cual es proporcional a la cantidad de producto amplificado (BIO-RAD Laboratories, 2006).

Figura 6.

Gráfico de Amplificación



Nota. Se puede visualizar la línea de base fluorescente sustraída resultante de la amplificación realizada. Adaptado de *Real Time PCR-Applications Guide* (p. 7), por BIO-RAD Laboratories, 2006.

Se pueden identificar dos fases, una fase exponencial seguida de una fase de meseta. A medida que la reacción avanza, en la fase exponencial la cantidad del producto se va a duplicar en cada ciclo de igual forma los componentes va a consumirse

transformándose en componentes limitantes. En el ciclo 28-40 de la Figura 6, se entra en una fase de meseta (no exponencial) es aquí donde la reacción se vuelve más lenta. El ciclo umbral (threshold) o Ct es el número de ciclo donde el producto amplificado se acumula para generar una señal fluorescente detectable. Los métodos de análisis para qPCR suelen ser la cuantificación absoluta y cuantificación relativa (BIO-RAD Laboratories, 2006).

Cuantificación Absoluta

La cuantificación absoluta se basa en la comparación del valor de Ct, de las muestras de prueba con una curva estándar. Este método nos da como resultado la cantidad de ácido nucleico (número de copias, μg) por cantidad dada de muestra (por célula, por μg de ARN total) (BIO-RAD Laboratories, 2006).

Cuantificación Relativa

El resultado de la cuantificación relativa es una proporción: la cantidad relativa (diferencia de veces) de un ácido nucleico objetivo para cantidades equivalentes de muestra de prueba y de control A frente a B.

La normalización de datos en ensayos de qPCR es importante para que dichos datos sean biológicamente significativos. Los normalizadores tienen un rol fundamental en la cuantificación relativa ya que, se utiliza para garantizar que se comparen cantidades objetivos de cantidades equivalentes de muestras. Resulta relevante, tener en cuenta que el nivel de expresión de un gen de referencia debe ser constante en todas las muestras de prueba y dicha expresión no sea alterada por algún tratamiento experimental (BIO-RAD Laboratories, 2006).

Cuantificación Relativa Normalizada contra Masa Unitaria. Las ventajas de usar una unidad de masa en lugar de un gen de referencia como normalizador son que el diseño experimental es relativamente simple y el tratamiento matemático es directo. En la cuantificación relativa se debe elegir una muestra como calibrador (muestra control) y la expresión del gen objetivo en el resto de muestras se expresa como un aumento o disminución en relación con el calibrador. Normalmente, la muestra sin tratamiento o de referencia se escoge como calibrador (BIO-RAD Laboratories, 2006).

$$Ratio_{(test/calibrator)} = E^{C_T(calibrator) - C_T(test)}$$

E es la eficiencia de la reacción, asumiendo que el ensayo tiene una eficiencia de amplificación perfecta (la plantilla se duplica en cada ciclo de amplificación), la ecuación anterior se presenta de la siguiente forma (BIO-RAD Laboratories, 2006):

$$Ratio_{(test/calibrator)} = 2^{C_T(calibrator) - C_T(test)}$$

$$Ratio_{(test/calibrator)} = 2^{\Delta C_T}; \text{ donde } \Delta C_T = C_T(calibrator) - C_T(test)$$

Cuantificación Relativa Normalizada con un Gen de Referencia. La ventaja de usar un gen de referencia (GAPDH, β -actina) en lugar de una unidad de masa como normalizador es que no es necesario realizar una cuantificación y cargas precisas del material de partida. Eso es realmente conveniente cuando se realizan experimentos de expresión génica relativa en los que el material de partida suele ser limitado. El inconveniente es que este método requiere la disponibilidad de un gen o genes de referencia conocidos con expresión constante en todas las muestras ensayadas y cuya expresión no se ve alterada por el tratamiento de estudio (BIO-RAD Laboratories, 2006).

Habitualmente, la muestra sin tratar o de referencia se elige como calibrador. En resumen, se debe determinar los valores de C_T , como se muestra en la siguiente tabla 2.

Tabla 2.

Valores C_T necesarios para la cuantificación relativa con el gen de referencia como normalizador.

	Prueba	Calibrador
Gen objetivo	$C_{T(\text{objetivo, prueba})}$	$C_{T(\text{objetivo, calibrador})}$
Gen de referencia	$C_{T(\text{ref, prueba})}$	$C_{T(\text{ref, calibrador})}$

Nota. La tabla muestra los datos o valores necesarios para la cuantificación relativa con un gen de referencia como normalizador de acuerdo a BIO-RAD Laboratories, 2006.

Existen tres métodos de cuantificación usando gen de referencia: 1) el método Livak, también conocido como el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 2) el método ΔC_t usando un gen de referencia y 3) el método Pfaffl. Cada método presenta ventajas y desventajas, así como supuestos que deben cumplirse para que los resultados del análisis sean verídicos (BIO-RAD Laboratories, 2006).

Tabla 3.

Métodos de cuantificación usando un gen de referencia

Método	Definición	Fórmulas
	Supone que tanto los genes diana como los de referencia se amplifican con eficiencias cercanas al 100% y con una diferencia del 5% entre sí.	$\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$
$2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak)	Cumplido el supuesto anterior se determina la diferencia relativa en el nivel de expresión de su gen objetivo en diferentes muestras.	$\Delta C_{T(\text{calibrator})} = C_{T(\text{target, test})} - C_{T(\text{ref, test})}$ $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{calibrator})}$ $2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{Relación de expresión normalizada}$
	El resultado obtenido es el aumento (o disminución) en veces del gen de prueba en la muestra de prueba	

Método	Definición	Fórmulas
	relativa con la muestra del calibrador.	
	Utiliza la diferencia entre los valores C_T de referencia y objetivo para cada muestra.	
Método ΔC_t usando un gen de referencia	La diferencia clave en los resultados es que el valor de expresión de la muestra del calibrador no es 1.0. Los supuestos matemáticos de este enfoque son los mismos del anterior.	$Ratio (reference / target) = 2^{C_{T(ref)} - C_{T(target)}}$
Método Pfaffl	Solo es válido cuando las eficiencias de amplificación de los genes diana y de referencia son similares. No es necesario que los genes objetivo y de referencia tengan la misma eficiencia de amplificación entre sí	$Ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta C_{T,target}(calibrator-test)}}{(E_{ref})^{\Delta C_{T,ref}(calibrator-test)}}$

Hipótesis

Existen diferencias significativas para la expresión del gen RGA2 de banano asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* entre los cultivares del Banco de Germoplasma de Banano de la EETP-INIAP.

Capítulo III: Materiales y métodos

Instituciones Participantes

El presente proyecto de investigación se desarrolló a partir de 25 de abril del 2023 hasta el 18 de agosto del 2023, con fondos del Programa Nacional de Banano, Plátano y otras Musáceas de la Estación Experimental Tropical Pichilingue-Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias y la colaboración del Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen.

Colaboradores Científicos

Francisco J. Flores Flor, PhD.

Tutor de tesis

Antonio Bustamante, PhD.

Investigador de la EETP-INIAP

Zona de Estudio

La toma de muestras de las diferentes accesiones de banano se llevó a cabo en el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias ubicados en el km 5 vía El Empalme – Quevedo. La parte experimental se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen.

Material Biológico

Se trabajó con 5 accesiones de banano (Figura 7) del Banco de Germoplasma la Estación Experimental Tropical Pichilingue-INIAP: dos diploides (AA), una triploide (AAA) y dos tetraploides (AAAB, AAAA) tal y como se indica en la tabla 4.

Tabla 4.

Genotipos y respuesta a Foc R4T de las accesiones de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP

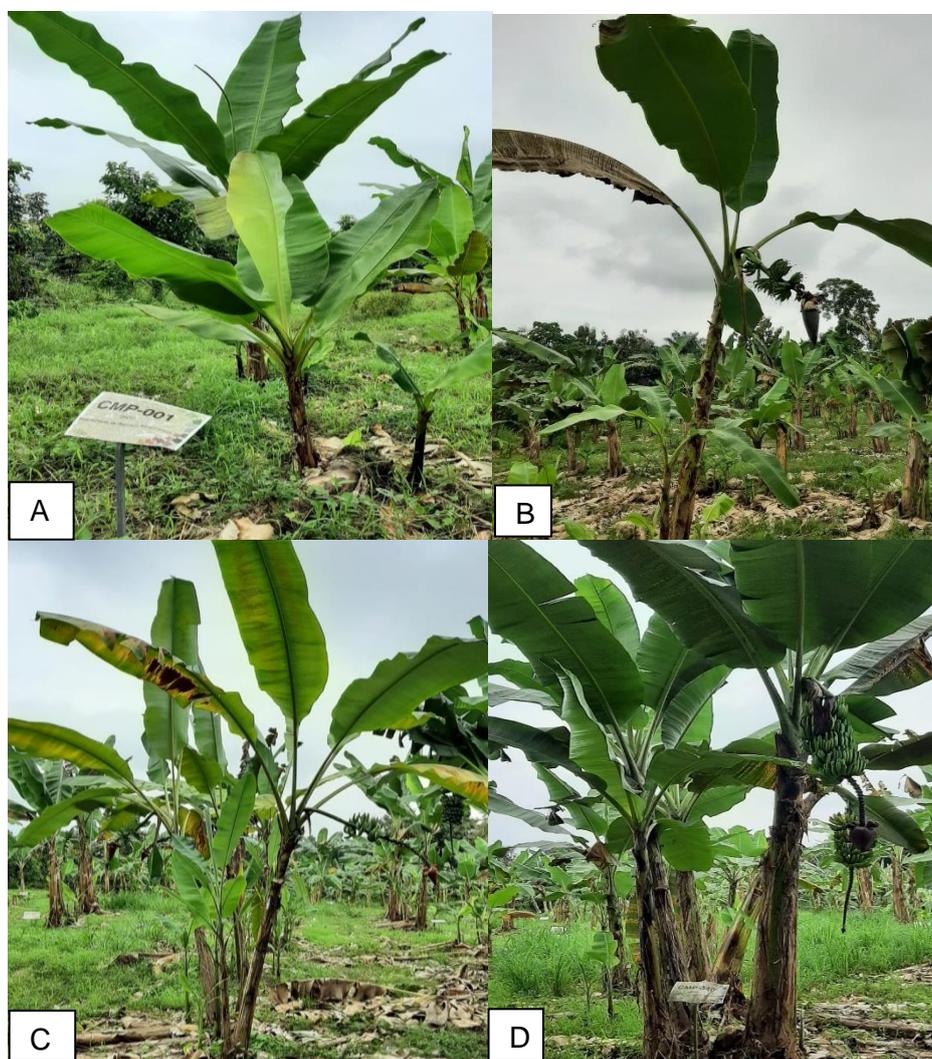
Código de la accesión	Nombre común	Genotipo	Ploidia	Respuesta Foc R4T
CMP-001	Orito	AA	Diploide	Susceptible

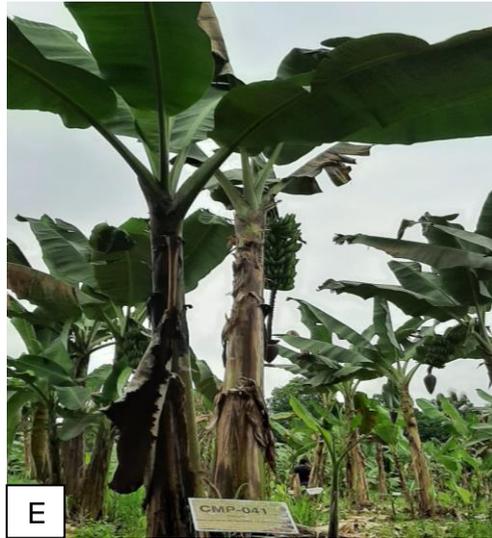
Código de la accesión	Nombre común	Genotipo	Ploidia	Respuesta Foc R4T
CMP-008	Ortaete 51	AAA	Triploide	Susceptible
CMP-025	<i>Musa acuminata</i>	AA	Diploide	Susceptible
CMP-040	FHIA 01	AAAB	Tetraploide	Tolerante
CMP-041	FHIA 02	AAAA	Tetraploide	Tolerante

Nota. Nombre común, genotipo y ploidía obtenido del Croquis de la Colección de las Variedades de Musáceas de la EETP-INIAP; Respuesta a Foc R4T obtenido del Diccionario de Colección de las Musáceas de la EETP-INIAP.

Figura 7.

Accesiones de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP.





Nota. Las imágenes representan las diferentes accesiones de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP. A) Orito; B) Ortaete 51; C) *Musa acuminata*; D) FHIA-01; E) FHIA-02.

Se tomó muestras de tejido foliar y raíces del Banco de Germoplasma de banano (Figura 8 y 9) los cuales fueron guardados en funda ziploc y transportados en un recipiente adecuado con bloques de hielo para preservar su integridad hasta el Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen.

Figura 8.

Muestras de hojas de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP



Nota. Las imágenes representan las muestras tomadas de hojas de cada una de las accesiones de banano. A) Orito; B) Ortaete 51; C) *Musa acuminata*; D) FHIA-01; E) FHIA-02.

Muestras de raíz de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP.



Nota. Las imágenes representan las muestras tomadas de raíces de cada una de las accesiones de banano. A) Orito; B) Ortaete 51; C) *Musa acuminata*; D) FHIA-01; E) FHIA-02.

Extracción de ARN

Se cortó tejido sano tanto de hojas como de raíces, se guardaron en fundas ziploc y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de extraer ARN. Para la obtención de ARN de buena calidad se probó dos diferentes métodos: E.Z.N.A Plant RNA Kit y método CTAB modificado por White et al., 2008.

E.Z.N.A Plant RNA Kit

Se procedió a limpiar la cámara de flujo con alcohol y una solución de RNAsa (terminator) y se dejó la cámara de flujo con UV durante 30 min. Se cortó el tejido foliar y las raíces en trozos pequeños y se introdujo en tubos de 2 mL con perlas metálicas, de igual forma se añadió 20 μ L de β -mercaptoetanol con 1 mL de TRK Lysis Buffer. Se homogenizó y centrifugó a 13400 x g durante 5 min para después transferir el sobrenadante limpio a un tubo nuevo de 1,5 mL. Se añadió un volumen de etanol al 70%, igual al volumen tomado del sobrenadante, y se homogenizó con vortex. Después se insertó una mini columna HiBind RNA dentro de un tubo de colección de 2 mL y se transfirió 700 μ L de muestra en las mini columnas HiBind RNA, se centrifugó a 9300 x g durante 1 min para descartar el filtrado y reusar el tubo de colección (se repitió este proceso hasta consumir toda la muestra). Se preparó una solución que contenga 75 μ L DNase I stock (73.5 μ L DNase I Digestion Buffer + 1.5 μ L DNase I) para cada muestra. Se añadió 250 μ L de RNA Wash Buffer I para después centrifugar a 9300 x g durante 1 min descartando el filtrado y reusando el tubo de colección. Se añadió 75 μ L de DNase I stock previamente preparada en la superficie de la membrana de la mini columna HiBind RNA. Se deja reposar a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadió 250 μ L de RNA Wash Buffer I y se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 9300 x g durante 1 min, descartando el filtrado y se reusó el tubo de colección. Se añadió 500 μ L de RNA Wash Buffer II diluido con 100% etanol y se centrifugó a 9300 x g por 1 min para descartar el filtrado y reusar el tubo de colección (este paso se repitió 2 veces). Se centrifugó la mini columna HiBind RNA vacía a máxima velocidad durante 2 min para secar la columna (este paso fue importante para remover las trazas de etanol). Se transfirió la mini columna HiBind RNA a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL. Finalmente, se añadió 40 μ L de agua libre de nucleasas para después centrifugar a máxima velocidad durante 2 min. Este ARN se almacenó a -20°C hasta su utilización (Bio-tek, 2015).

Método CTAB modificado

Como reactivos y soluciones se utilizó agua destilada (dH₂O) sin DEPC para la preparación de todas las soluciones. El buffer de extracción comprendía: CTAB al 2%; polivinilpirrolidona (PVP) K-40 soluble al 2%; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25 mM (pH 8,0); Tris-HCl 100 mM (pH 8,0); NaCl 2M; 3% de β-mercaptoetanol (añadido al tampón precalentado en autoclave antes de la extracción). También se utilizó etanol 70% filtrado, cloroformo-isoamilalcohol (C: I) en una proporción de 24:1 y LiCl 8 M. Todas las soluciones Stock para la preparación del buffer CTAB fueron autoclavados.

Se cortó el tejido foliar y las raíces de banano en trozos pequeños. Se precalentó 1,2 ml de buffer de extracción (3 % de β-mercaptoetanol añadido) para cada muestra en un tubo de 2 ml a 65 °C en baño maría. Se cortó y pesó 250 mg de material vegetal y se colocó en el tubo con 3 perlas metálicas de 3 mm de diámetro junto con el buffer de extracción CTAB. Cada uno de los tubos se ubicaron en un homogeneizador a 50 HZ de frecuencia y 1500 rpm durante 7 min para poder realizar la ruptura del tejido. Inmediatamente, se agitó en un vortex durante 1 min para después incubar en baño maría durante al menos 30 minutos con vortex una vez cada 5 min. Se centrifugó a máxima velocidad (16000 x g) durante 10 min, para después transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 mL y se transfirió el mismo volumen de cloroformo: alcohol isoamílico C:I (24:1) con vortex durante 30 s y centrifugación a máxima velocidad durante 15 min a 4 °C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 mL (repetir el paso de la extracción con C:I). Se añadió 1/3 de volumen de LiCl 8M al sobrenadante en un tubo de 1,5 mL y se mezcló mediante pipeteo para después almacenarlo a -20 °C durante toda la noche. Después de la incubación se centrifugó los tubos a máxima velocidad durante 60 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y lavamos cada sedimento con 800 µL de etanol al 70 % filtrado para después centrifugar a 14000 g durante 20 min (el lavado con etanol se repitió 2 veces). Retiramos el etanol y dejamos secar cada tubo al aire durante 10 min. Finalmente, se resuspendió el sedimento

en 25 μL de agua libre de nucleasas y almacenamos cada ARN a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (White et al., 2008).

Análisis de Cantidad y Calidad de ARN

La cuantificación y detección de la pureza de las muestras de ARN total se realizó midiendo la absorbancia de $2\mu\text{L}$ de ARN a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000c.

Además, se visualizó el ARN en un gel de agarosa 1% pesando $0,40\text{ g}$ de agarosa en 40 mL de TBE 1X y se tiñó el gel con $5\text{ }\mu\text{L}$ de bromuro de etidio. Se tomó alícuotas de $4\text{ }\mu\text{L}$ de ARN junto con $2\text{ }\mu\text{L}$ buffer de carga 5X Green GoTaq[®]. Se incubó la mezcla a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min y se cargó en el gel de agarosa empleando una fuente de poder VWR a 90 V durante 30 min . Finalmente, se visualizó los resultados en un transiluminador UV.

Preparación de ADNc (Transcripción Inversa)

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El volumen de reacción que se utilizó fue de $20\text{ }\mu\text{L}$ que es adecuado para 10 pg – $5\text{ }\mu\text{g}$ de ARN total. A continuación, se mezcló los componentes que se indican en la tabla 5 en un tubo PCR de $200\text{ }\mu\text{L}$, se incubó en baño maría durante 5 min a 65°C para después guárdalo en hielo por 1 min .

Tabla 5.

Componentes iniciales.

Reactivo	Concentración	Cantidad (μL)
oligo(dT) ₂₀	$50\text{ }\mu\text{M}$	1
dNTP Mix	10 mM	1
H ₂ O	-	9
ARN	-	2
		13

Se preparó un master mix en otro tubo PCR de 200 μ L de acuerdo a los componentes de la tabla 6, se homogenizó mediante pipeteo y se centrifugó rápidamente.

Tabla 6.

Master mix para la síntesis de ADNc a partir del ARN molde.

Reactivo	Concentración	Cantidad (μ L)
5X First-Strand Buffer	5X	4
0.1 M DTT	0,1 M	1
RNaseOUT™	40 unidades/ μ L	1
SuperScript™ RT	200 unidades/ μ L	1
		7

Se dispensaron 7 μ L del master mix en el tubo PCR de los componentes iniciales (tabla 5), se mezcló mediante pipeteo y se incubó a 50 °C durante 30-60 min, posteriormente inactivamos la reacción calentando a 70°C durante 15 min. Después, se agregó 1 μ L de RNase H a 37 °C durante 20 min. Finalmente se almacenó a -20 °C hasta su uso en la qPCR.

Desarrollo de Ensayos de qPCR

Se utilizó el PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix siguiendo las instrucciones del fabricante. Se uso 1-10 ng de ADNc monocatenario. Además, se realizó el experimento por duplicado teniendo en cuenta también de incluir un 10% en cada reacción para corregir los errores de pipeteo. Los controles NTC por sus siglas en ingles "no template control" son controles sin plantilla (ADN) y son esenciales para detectar contaminación o amplificación no específica, siendo estos nuestras muestras negativas (Biosearch Technologies, s.f.). Tal y como se indica en Podevin et al., 2012, una combinación de genes de referencia (EF1, TUB, ACT) se considera recomendable para el análisis de expresión génica en muestras de hojas de invernadero. Por otro lado, en el estudio realizado por Zhang et al., 2017, se indica

que TUB y ACT1 son genes estables y son adecuados para usarse como normalizadores en expresión génica de banano bajo la inducción de resistencia al marchitamiento por *Fusarium*. En este caso, los genes de referencia que se utilizan en esta investigación son (TUBB, ACT3). Los cebadores utilizados se detallan en la tabla 7.

Tabla 7.

Secuencias de los cebadores RGA2, TUBB, ACT3 y longitud del producto esperado durante la amplificación.

Gen	Nombre	Cebador (C1)	Tm (C1)	GC% (C1)	Cebador (C2)	Tm (C2)	GC% (C2)	Longitud del producto
RGA2	Resistance gene candidate 2	GGAGGTGATGATT GGCCCTT	59.74	55.00	GCCAATCGAAGTCC TTGAAGC	59.87	52.38	707
TUBB	Tubulin beta chain	GGAGAACTGCGAT TGCTTGC	60.18	55.00	TGAACGGACAGTGT GGCATT	60.18	50.00	1110
ACT3	Actin-3	GTTCCATGGTCCC CAAGTCA	59.60	55.00	AGCAGTGATGTTAT GGCAGT	57.20	45.00	173

Tabla 8.

Configuración de reacciones PCR.

Componentes	Cantidad (µL/pocillo)
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	5
Forward	0,5
Reverse	0,5
H ₂ O	3
ADN	1
Total	10

Se mezcló bien los componentes de la PCR (tabla 8) con la finalidad de eliminar las burbujas de aire, para posteriormente transferir cada volumen de reacción al termociclador en tiempo real Gentier48E. Como primer paso en el ciclo térmico de PCR, tenemos la

activación UDG. Las uracilo-ADN glicosidasas (UDG) hacen referencia a enzimas reparadoras del ADN evolutivas y bien conservadas. Eliminan el uracilo (que normalmente se encuentra en el ARN) del ADN, creando uracilo libre y sitios apirimídicos sensibles a los álcalis en el ADN. Además, permite los productos no específicos mal cebados se degraden, dejando intactas las plantillas de ácido nucleico nativo destinadas a la amplificación (ThermoFisher, s.f.).

Tabla 9.

Condiciones de ciclo térmico de PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación UDG	50°C	2 minutos	1
Activación	95°C	2 minutos	1
Desnaturalización	95°C	1-3 segundos	40
Extensión	60°C	30 segundos	

Tabla 10.

Condiciones de la curva de disociación (etapa de la curva de fusión).

Paso	Tasa de rampa	Temperatura	Tiempo
1	1.6°C/segundos	95°C	15 segundos
2	1.6°C/segundos	60°C	1 minuto
3	0.15°C/segundos	95°C	15 segundos

La amplificación de qPCR se llevó a cabo usando el termociclador en tiempo real Gentier48E, con las condiciones señaladas en la tabla 9 y 10.

Análisis de Datos de qPCR

El ensayo se realizó por separado, primero se ingresó las muestras de tejido foliar después las raíces, comparando la expresión del gen RGA2 con los genes de referencia actina y β -tubulina utilizando el programa Gentier48E Real-Time PCR System. Para el análisis de datos se utilizó cuantificación relativa mediante el método Δ Ct usando genes de referencia. Los valores Ct generados por la qPCR fueron analizados también en el programa Excel.

Capítulo VI: Resultados

Extracción de ARN

Se aplicaron 2 métodos de extracción de ARN: E.Z.N.A. Plant RNA Kit y CTAB modificado a todas las muestras (tejido foliar y raíces) de las diferentes accesiones de banano. La extracción de ARN con E.Z.N.A. Plant RNA Kit resultó en concentraciones entre 4,1-10,1 ng/μL de ARN, con una relación de absorbancia 260/280 entre 1,09 y 1,87, y una relación de absorbancia 260/230 entre 0,16 y 0,30 (tabla 11). Por otro lado, la extracción de ARN aplicando el protocolo de CTAB modificado resultó en ARN de mejor calidad y cantidad. Se obtuvo concentraciones entre 26,7 y 592,5 ng/μL, mientras que la relación de absorbancia 260/280 se encontró entre 2,00 y 2,30 y la relación 260/230 fue de 0,90 a 2,49. Los resultados obtenidos en las muestras de tejido foliar fueron mejores comparados con las raíces (tabla 11).

Tabla 11.

Cantidad y Calidad de ARN obtenido

Método de extracción	Material vegetal	Abs _{260/280}	Abs _{260/230}	Cantidad (ng/μL)
E.Z.N.A. Plant RNA Kit	CMP-H-001	1.75	0.21	4.3
	CMP-H-008	1.40	0.20	5.2
	CMP-H-025	1.36	0.30	4.6
	CMP-H-040	1.66	0.37	5.5
	CMP-H-041	1.87	0.28	7.1
	CMP-R-001	1.66	0.19	7.4
	CMP-R-008	1.33	0.25	5.1
	CMP-R-025	1.66	0.19	6.7
	CMP-R-040	1.29	0.20	4.1
	CMP-R-041	1.09	0.16	10.1
CTAB modificado	CMP-H-001	2.15	1.96	87.8
	CMP-H-008	2.13	2.10	130.5
	CMP-H-025	2.14	2.12	326.0
	CMP-H-040	2.11	1.95	592.5

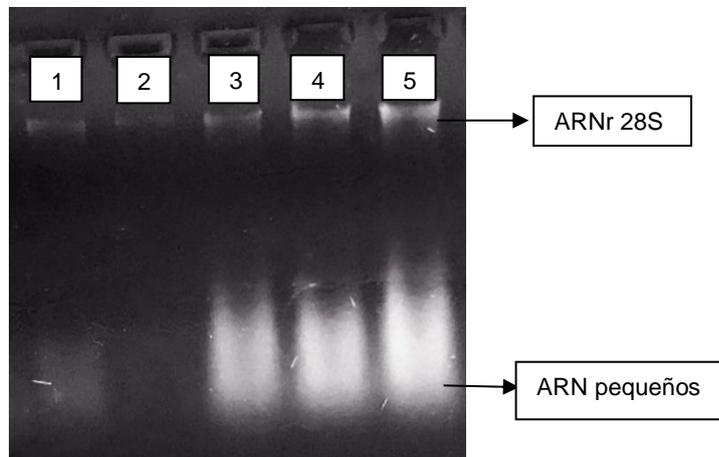
Método de extracción	Material vegetal	Abs _{260/280}	Abs _{260/230}	Cantidad (ng/μL)
	CMP-H-041	2.08	2.03	560.7
	CMP-R-001	2.01	1.44	68.1
	CMP-R-008	2.00	0.90	71.1
	CMP-R-025	2.12	1.85	47.7
	CMP-R-040	2.04	1.60	68.3
	CMP-R-041	2.07	1.74	104.7

CMP-H: Muestra hoja; CMP-R: Muestra raíz

Adicionalmente se corrió un gel de agarosa 1% con el fin de evaluar de mejor manera la integridad del ARN tanto para las muestras de tejido foliar como raíces utilizando el ARN obtenido del protocolo de CTAB modificado, ya que fue donde se obtuvo mejores resultados. En la figura 10, las muestras de tejido foliar de *Musa acuminata*, FHIA-01, FHIA-02 (carril 3,4 y 5 respectivamente) se visualizan bandas claras en la parte superior que representa ARNr 28S, las bandas inferiores que se muestran degradadas representan ARN pequeños. En la muestra Orito (carril 1) se visualiza una banda tenue en la parte superior (ARNr 28S), además se presenta una banda tenue en la parte inferior representando a los ARN pequeños. Mientras que en la accesión Ortaete 51 (carril 2) solo se visualiza una banda tenue en la parte superior siendo esta del ARNr 28S.

Figura 9.

Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN de tejido foliar de las diferentes accesiones de banano.

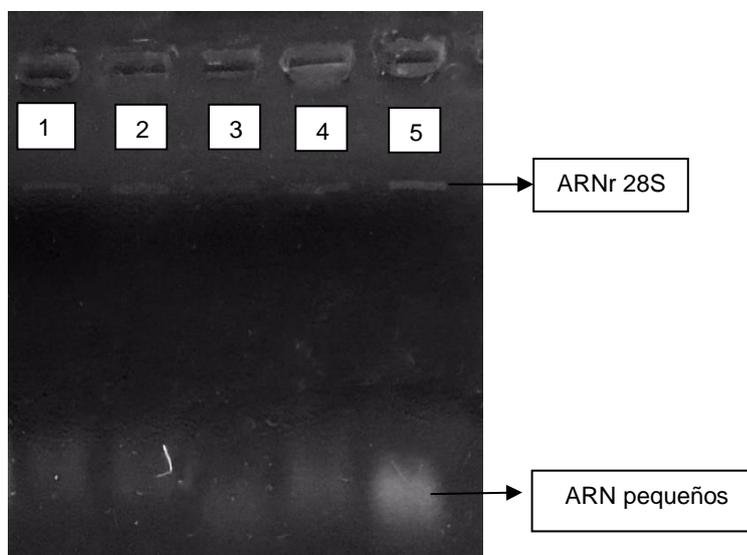


Nota. Carril 1: Orito, Carril 2: Ortaete 51, Carril 3: *Musa acuminata*, Carril 4: FHIA-01, Carril 5: FHIA-02.

En la figura 11, en todas las muestras de raíces se puede visualizar una banda tenue en la parte superior, las cuales corresponden al ARNr 28S. De igual manera, se puede apreciar bandas tenues en la parte inferior correspondientes a los ARN pequeños.

Figura 10.

Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN de raíces de las diferentes accesiones de banano.



Nota. Carril 1: Orito, Carril 2: Ortaete 51, Carril 3: *Musa acuminata*, Carril 4: FHIA-01, Carril 5: FHIA-02.

Preparación de ADNc (transcripción inversa)

Se utilizó los ARN con mejor calidad y cantidad para el proceso de la retrotranscripción, en donde se obtuvo ADNc de 988.8-4748 ng/ μ L con una relación de absorbancia 260/280 de 1.75-1.82 mientras la relación 260/230 estuvo entre 1.73 y 2.19 (tabla 12). Estos ADNc fueron diluidos a concentraciones de \sim 100 ng/ μ L obteniéndose valores entre 63.2-140.8 ng/ μ L (tabla 13). Las diluciones de ADNc a concentraciones de \sim 10 ng/ μ L se muestran en la tabla 14, donde se obtuvieron valores entre 6.0 y 11.7 ng/ μ L.

Tabla 12.

Cantidad y calidad de ADNc obtenido.

Material vegetal	Abs_{260/280}	Abs_{260/230}	Cantidad (ng/μL)
CMP-H-001	1.75	1.74	1918.2

Material vegetal	Abs_{260/280}	Abs_{260/230}	Cantidad (ng/μL)
CMP-H-008	1.77	2.04	2522.5
CMP-H-025	1.82	2.19	4748.6
CMP-H-040	1.76	1.73	988.8
CMP-H-041	1.77	1.91	1545.6
CMP-R-001	1.76	1.94	1395.0
CMP-R-008	1.78	2.02	1884.5
CMP-R-025	1.78	1.99	1919.3
CMP-R-040	1.78	1.99	1907.8
CMP-R-041	1.77	1.96	1975.6

CMP-H: Muestra hoja; CMP-R: Muestra raíz

Tabla 13.

Cantidad y calidad de ADNc diluido (~100 ng/μL) obtenido.

Material vegetal	Abs_{260/280}	Abs_{260/230}	Cantidad (ng/μL)
CMP-H-001	1.79	1.84	108.0
CMP-H-008	1.84	2.26	102.7
CMP-H-025	1.78	2.14	63.2
CMP-H-040	1.71	2.11	121.0
CMP-H-041	1.75	2.01	118.7
CMP-R-001	1.76	2.24	140.8
CMP-R-008	1.79	1.98	102.4
CMP-R-025	1.77	2.04	108.4
CMP-R-040	1.78	2.21	100.5
CMP-R-041	1.78	2.12	100.1

CMP-H: Muestra hoja; CMP-R: Muestra raíz

Tabla 14.

Cantidad y calidad de ADNc diluido (~10 ng/μL) obtenido.

Material vegetal	Abs_{260/280}	Abs_{260/230}	Cantidad (ng/μL)
CMP-H-001	2.03	1.64	7.1
CMP-H-008	2.62	2.43	6.0
CMP-H-025	1.82	1.45	10.4
CMP-H-040	1.43	1.30	10.6
CMP-H-041	2.15	4.83	10.8
CMP-R-001	1.89	3.33	8.3
CMP-R-008	1.72	1.53	10.4
CMP-R-025	2.16	18.00	11.3
CMP-R-040	1.91	7.19	10.1
CMP-R-041	1.96	1.95	11.7

CMP-H: Muestra hoja; CMP-R: Muestra raíz

Ensayos de qPCR

En la figura 12, se presenta como fue distribuido el ensayo de qPCR para las muestras de tejido foliar. A continuación, se visualiza la gráfica de amplificación (figura 13) donde las curvas de color rojo y amarillo corresponden a gen β -tubulina, las curvas de color verde y celeste corresponden al gen actina, mientras que las de color azul y violeta representan al gen RGA2. En cada una de las curvas de amplificación se puede apreciar una fase lineal, fase exponencial y una fase de meseta (no exponencial), siendo diferente el ciclo umbral (threshold) o valor Ct para cada una de las muestras.

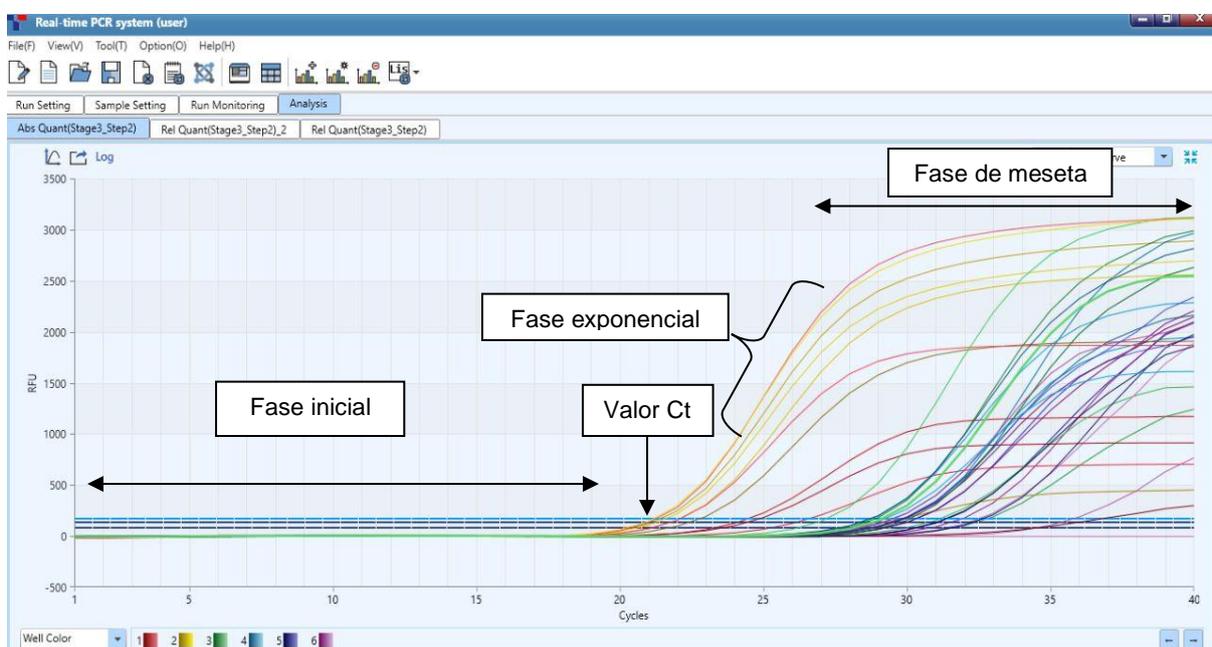
Figura 11.

Distribución del ensayo qPCR para las muestras de tejido foliar con los genes TUBB, ACT3 y RGA2.

Sample	1	2	3	4	5	6
A	H1 TUB TUB Ref Dye	H1 TUB TUB Ref Dye	H1 ACT ACT Ref Dye	H1 ACT ACT Ref Dye	H1 RGA2 Ref Dye	H1 RGA2 Ref Dye
B	H8 TUB TUB Ref Dye	H8 TUB TUB Ref Dye	H8 ACT ACT Ref Dye	H8 ACT ACT Ref Dye	H8 RGA2 Ref Dye	H8 RGA2 Ref Dye
C	H25 TUB TUB Ref Dye	H25 TUB TUB Ref Dye	H25 ACT ACT Ref Dye	H25 ACT ACT Ref Dye	H25 RGA2 Ref Dye	H25 RGA2 Ref Dye
D	H40 TUB TUB Ref Dye	H40 TUB TUB Ref Dye	H40 ACT ACT Ref Dye	H40 ACT ACT Ref Dye	H40 RGA2 Ref Dye	H40 RGA2 Ref Dye
E	H41 TUB TUB Ref Dye	H41 TUB TUB Ref Dye	H41 ACT ACT Ref Dye	H41 ACT ACT Ref Dye	H41 RGA2 Ref Dye	H41 RGA2 Ref Dye
F	NTC TUB Ref Dye	NTC TUB Ref Dye	NTC ACT Ref Dye	NTC ACT Ref Dye	NTC RGA2 Ref Dye	NTC RGA2 Ref Dye
G						

Figura 12.

Gráfica de amplificación de las muestras de tejido foliar con los genes RGA2, TUBB, ACT3.



Nota. Curvas rojas y amarillas: Gen TUBB; Curvas verdes y celestes: Gen ACT3; Curvas azules y violetas: Gen RGA2.

Los valores Ct obtenidos para el tejido foliar se muestran en la tabla 15. Se puede apreciar que tanto para el gen β -tubulina, actina y RGA2 se obtuvo valores Ct en el control NTC. En el gen β -tubulina se obtuvo valores NTC de 20,520 y 20,309. Para el gen actina se obtuvo un NTC de 28,910 y 28,949, mientras que para el gen RGA2 solo se obtuvo un valor de 32,566. Los valores Ct para los genes de referencia β -tubulina y actina (TUBB y ACT3) en tejido foliar de las diferentes accesiones de banano son parecidas teniendo un valor alrededor de ~ 23 para el gen TUBB y ~29 para el gen ACT3.

Tabla 15.

Valores Ct obtenidos para cada una de las muestras de tejido foliar.

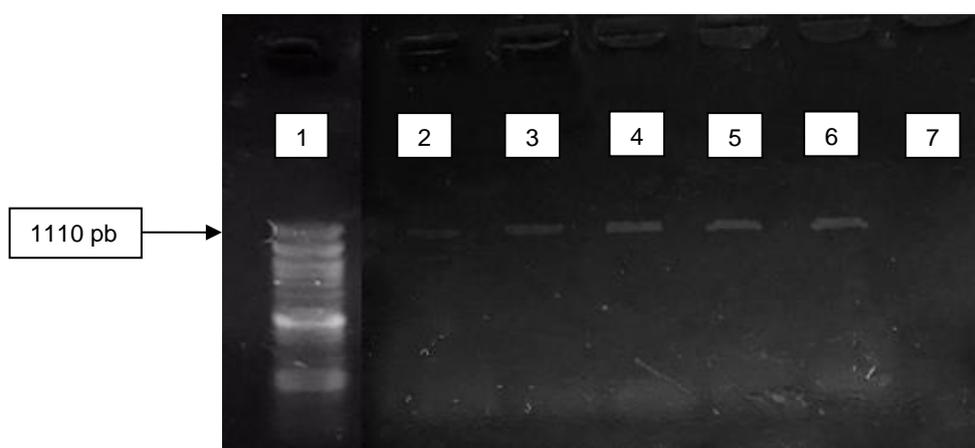
Gen	Muestra	Valor Ct	
β-tubulina (TUBB)	Orito	23,678	21,531
	Ortaete 51	23,691	28,191
	<i>Musa acuminata</i>	23,355	20,559
	FHIA-01	25,316	21,184
	FHIA-02	21,168	20,691
	NTC	20,520	20,309
	Orito	29,816	28,520
Actina (ACT3)	Ortaete 51	28,691	29,566
	<i>Musa acuminata</i>	32,465	29,669
	FHIA-01	30,887	29,270
	FHIA-02	26,980	28,449
	NTC	28,910	28,949
RGA2	Orito	31,402	29,980
	Ortaete 51	32,684	30,348

Gen	Muestra	Valor Ct	
	<i>Musa acuminata</i>	31,441	31,980
	FHIA-01	30,418	29,559
	FHIA-02	29,910	35,824
	NTC	-	32,566

Con el fin de comprobar que los valores Ct de los NTC representan dímeros y no contaminación, se corrió un gel de agarosa al 1% de todas las muestras con el gen β -tubulina incluido el control NTC. En la figura 13, a partir del carril 2 hasta el carril 6 se logran visualizar bandas tenues, adicionalmente en la parte inferior se ve unas ligeras bandas que se asumen que son dímeros. En el carril 7, que representa el control NTC no se visualiza ninguna banda.

Figura 13.

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de qPCR de las muestras de tejido foliar con el gen β -tubulina.



Nota. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Orito, Carril 3: Ortaete 51, Carril 4: *Musa acuminata*, Carril 5: FHIA-01, Carril 6: FHIA-02, Carril 7: NTC (Control negativo).

Para el ensayo de qPCR de las raíces se distribuyeron de la misma forma que el tejido foliar tal y como se indica en la figura 15. Además, se presenta un gráfico de

amplificación donde las curvas de color rojo y amarillo corresponden a los ensayos realizados con el gen β -tubulina, las curvas verdes y celestes son del gen actina y las de color azul y violeta están asociados al gen RGA2. Cada una de las curvas consta de una fase lineal, fase exponencial, fase de meseta y un ciclo umbral o valor Ct (figura 16).

Figura 14.

Distribución del ensayo qPCR para las muestras de raíz con los genes TUBB, ACT y RGA2.

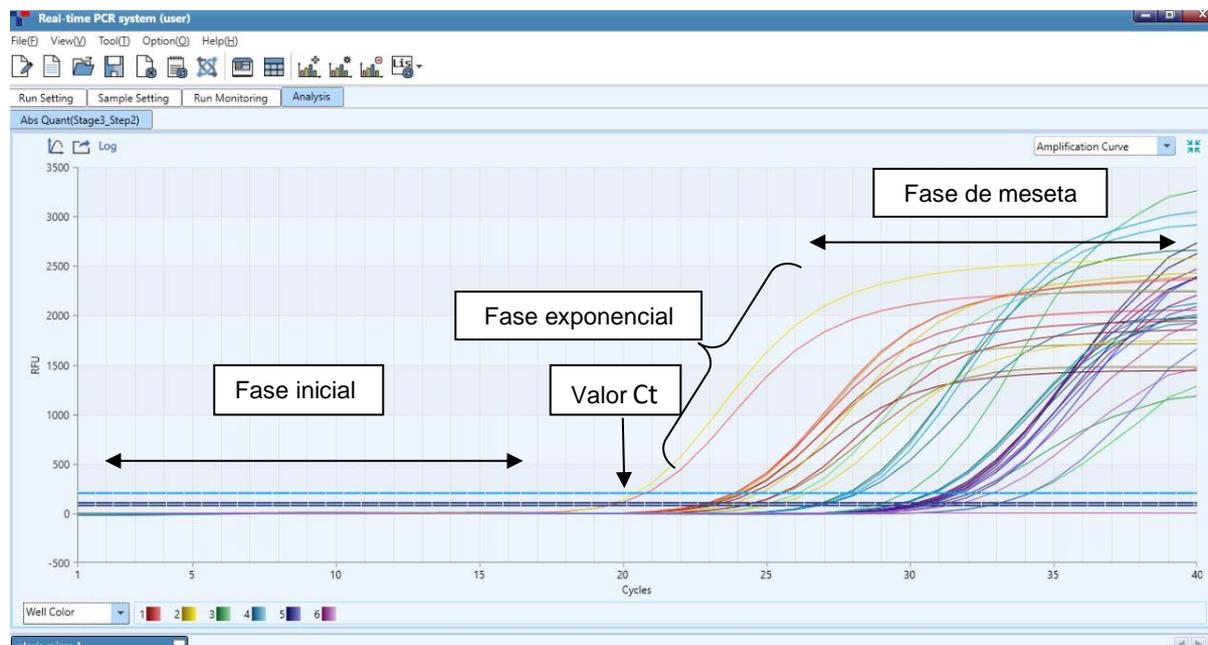
	1	2	3	4	5	6
A	TUB R1 TUB Ref Dye	TUB R1 TUB Ref Dye	ACT R1 ACT Ref Dye	ACT R1 ACT Ref Dye	RGA2 R1 Ref Dye	RGA2 R1 Ref Dye
	TUB R8 TUB Ref Dye	TUB R8 TUB Ref Dye	ACT R8 ACT Ref Dye	ACT R8 ACT Ref Dye	RGA2 R8 Ref Dye	RGA2 R8 Ref Dye
C	TUB R25 TUB Ref Dye	TUB R25 TUB Ref Dye	ACT R25 ACT Ref Dye	ACT R25 ACT Ref Dye	RGA2 R25 Ref Dye	RGA2 R25 Ref Dye
	TUB R40 TUB Ref Dye	TUB R40 TUB Ref Dye	ACT R40 ACT Ref Dye	ACT R40 ACT Ref Dye	RGA2 R40 Ref Dye	RGA2 R40 Ref Dye
E	TUB R41 TUB Ref Dye	TUB R41 TUB Ref Dye	ACT R41 ACT Ref Dye	ACT R41 ACT Ref Dye	RGA2 R41 Ref Dye	RGA2 R41 Ref Dye
	TUB NTC Ref Dye	TUB NTC Ref Dye	ACT NTC Ref Dye	ACT NTC Ref Dye	RGA2 NTC Ref Dye	RGA2 NTC Ref Dye
G						

Legend: Unknown (blue), Standard (orange), Positive (red), Negative (grey), NTC (green), NRC (purple), Control (teal)

alexis raices 1

Figura 15.

Gráfica de amplificación de las muestras de raíces con los genes *RGA2*, *TUBB*, *ACT3*.



Nota. Curvas rojas y amarillas: Gen *TUBB*; Curvas verdes y celestes: Gen *ACT3*; Curvas azules y violetas: Gen *RGA2*.

Los valores Ct para los controles NTC también estuvieron presentes en los ensayos con raíces. Para el gen β -tubulina los valores de NTC fueron 19,574 y 19,348. De la misma forma con el gen actina en las muestras control NTC se obtuvo valores de 25,301 y 27,277. Mientras que para el gen *RGA2* únicamente se obtuvo un valor de 34,199 (tabla 16). De la misma forma, los valores Ct para los genes de referencia β -tubulina y actina (*TUBB* y *ACT3*) fueron similares, teniendo un valor Ct en el gen *TUBB* alrededor de ~23, mientras que para el gen *ACT3* fue de ~29.

Tabla 16.

Valores Ct obtenidos para cada una de las muestras de raíz.

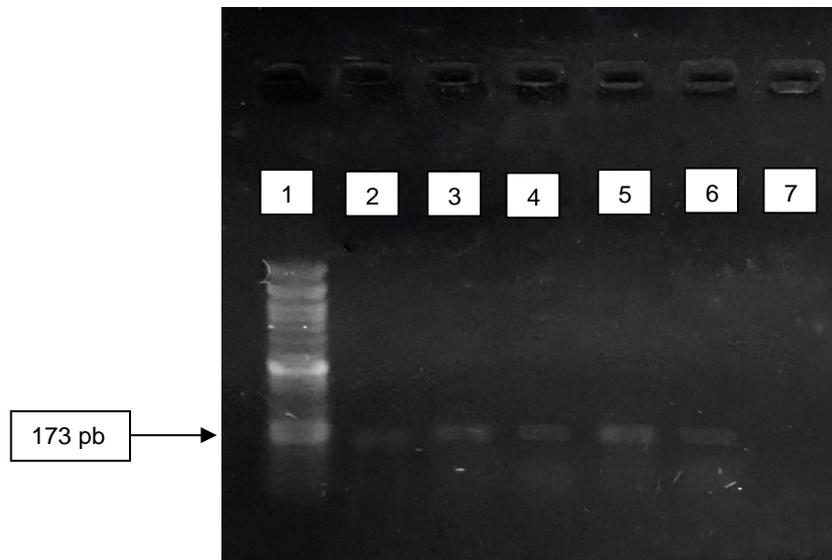
Gen	Muestra	Valor Ct
	Orito	23,004 24,082

Gen	Muestra	Valor Ct		
β-tubulina (TUBB)	Ortaete 51	24,137	22,637	
	Musa acuminata	22,824	22,645	
	FHIA-01	22,527	23,465	
	FHIA-02	22,590	25,051	
	NTC	19,574	19,348	
	Orito	27,004	30,309	
	Ortaete 51	29,840	27,277	
	Musa acuminata	31,027	29,926	
	FHIA-01	29,113	29,824	
	FHIA-02	33,191	27,137	
Actina (ACT3)	NTC	25,301	27,277	
	Orito	31,527	31,316	
	Ortaete 51	31,629	31,668	
	Musa acuminata	31,824	31,410	
	FHIA-01	32,371	32,160	
	FHIA-02	31,793	32,902	
	NTC	34,199	-	
	<hr/>			

En esta ocasión, se corrió un gel de agarosa 1% con todas las muestras de raíz utilizando el gen actina con el fin de visualizar que no exista contaminación en el control NTC. En la figura 15, se logra visualizar bandas tenues del carril 2 hasta el carril 6, las bandas que se encuentran en la parte inferior representan los dímeros. Mientras que en el carril 7 no se identifica ninguna banda, razón por la cual se asume que no hay contaminación en la muestra control NTC.

Figura 16.

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de qPCR de las muestras de raíz con el gen actina.



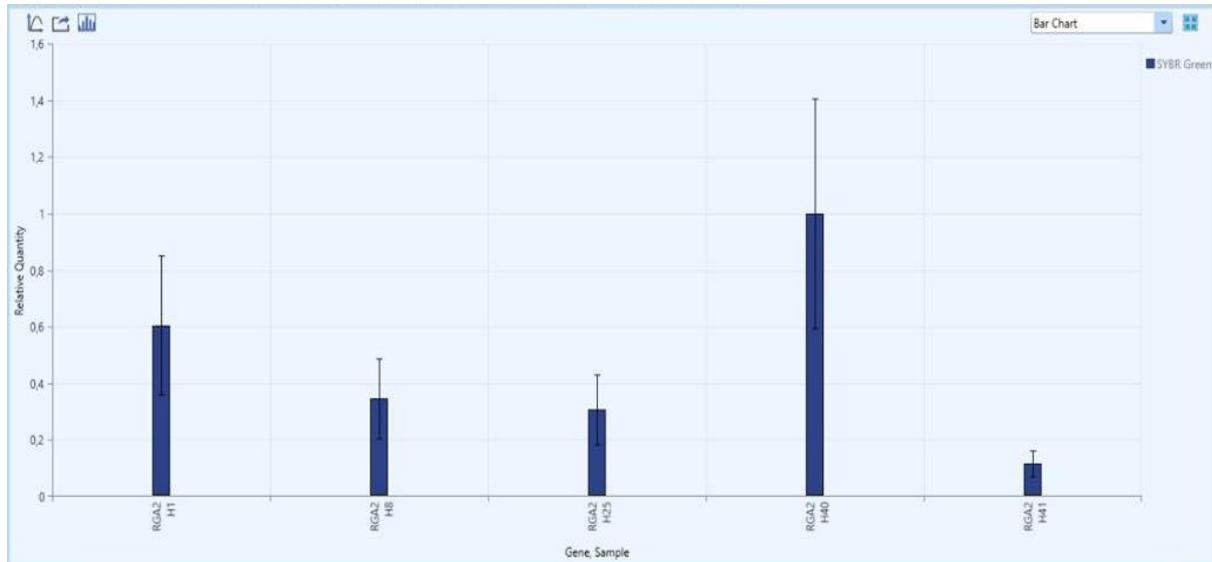
Nota. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Orito, Carril 3: Ortaete 51, Carril 4: *Musa acuminata*, Carril 5: FHIA-01, Carril 6: FHIA-02, Carril 7: NTC (Control negativo).

Análisis de Datos qPCR

En la figura 18, se indica que el tejido foliar de FHIA-01 tiene el mayor nivel de expresión del gen RGA2 entre las accesiones de banano analizadas. Es así, que la accesión Orito tiene un nivel de expresión del gen RGA2 que es 2 veces menor, las accesiones Ortaete 51 y *Musa acuminata* tienen un nivel de expresión del gen de interés 3 veces menor que en la accesión FHIA-01. El gen RGA2 en la accesión FHIA-02 tiene el nivel de expresión más bajo, expresándose 10 veces menos que la accesión FHIA-01. Podemos decir que, si se observan diferencias del nivel de expresión del gen RGA2 en tejido foliar entre las accesiones de banano.

Figura 17.

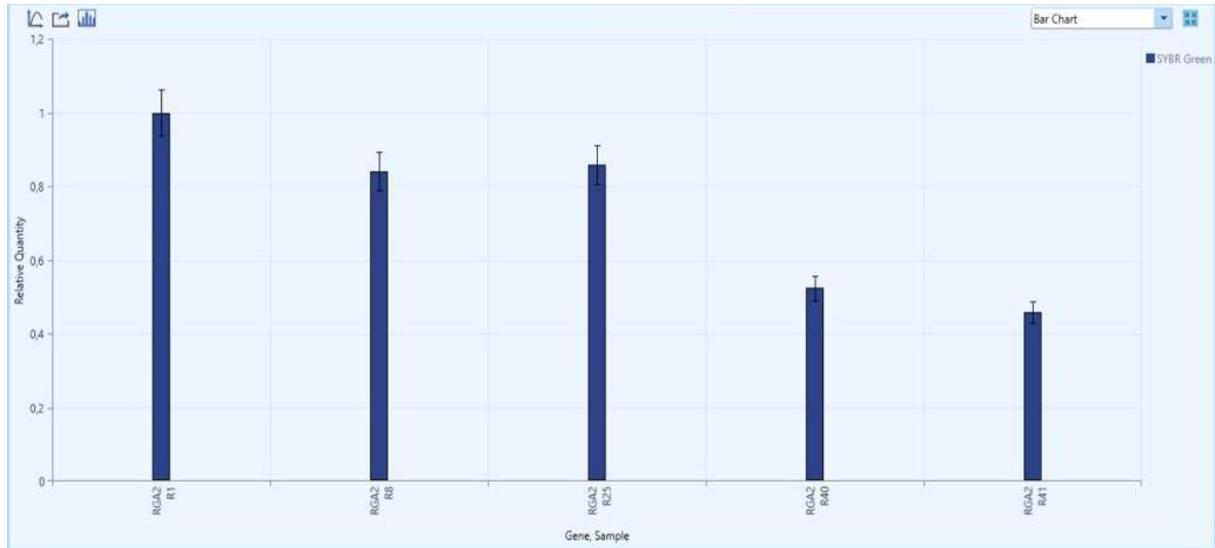
Gráfico de barras del análisis de expresión génica del gen RGA2 en tejido foliar de las diferentes accesiones banano.



En la figura 19, podemos identificar que las raíces de la accesión Orito tienen el mayor nivel de expresión del gen RGA2 que en el resto de accesiones de banano. Aunque las raíces de las accesiones Ortaete 51 y *Musa acuminata* presentan un menor nivel de expresión comparado con la accesión Orito, no existe gran diferencia entre las 3 accesiones de banano. La expresión del gen RGA2 en las raíces de las accesiones FHIA-01 y FHIA-02, de igual forma no presentan gran diferencia, únicamente se expresa 2 veces menos comparado con las raíces de la accesión Orito. Es así que, no se observan diferencias del nivel de expresión del gen RGA2 en raíces entre las acciones de banano.

Figura 18.

Gráfico de barras del análisis de expresión génica del gen RGA2 en raíz de las diferentes accesiones banano.



Capítulo V: Discusión

Según White et al., 2008, la obtención de ARN de alta calidad de muestras de tejido vegetal continúa siendo un problema, incluso con las numerosas modificaciones que se hacen a los diferentes protocolos y el descubrimiento de nuevos buffers de extracción. El principal desafío que usualmente se presenta, es el tipo de muestra a tratar y los contaminantes que presenta, estos pueden ser polifenoles, metabolitos secundarios y polisacáridos (Logemann et al., 1987). En un estudio realizado por Wuyts et al., 2006, se indica que los compuestos fenólicos están siempre presentes en el tejido vegetativo del banano. Con ayuda de cromatografía líquida de alta resolución se reveló que específicamente se tratan de ácidos fenólicos (Bashmil et al., 2021). En la presente investigación, trabajamos con tejido foliar y radicular de las diferentes accesiones de banano, las cuales como se detalla anteriormente presentan gran cantidad de compuestos fenólicos siendo un problema para el aislamiento de ARN. White et al., 2008, señala que el método debe ser rápido, seguro, eficiente, económico y lo más importante versátil. En este caso, el mejor resultado fue la extracción de ARN mediante CTAB modificado (tabla 11), siendo este un método rápido, seguro y económico, a diferencia de trabajar con el E.Z.N.A. Plant RNA kit, que evidentemente generó malos resultados y su costo es más elevado. La eficiencia del método CTAB modificado puede atribuirse al uso del β -mercaptoetanol. Según Chang et al., 1993, el β -mercaptoetanol es un fuerte agente reductor con la capacidad de romper enlaces disulfuro, por lo cual una adición o aumento de la concentración de aquel reactivo reduce la oxidación de polifenoles inactivando las ribonucleasas, obteniendo como resultado un método robusto, rápido y confiable.

Tal y como se presenta en la tabla 11, mediante el método de extracción E.Z.N.A. Plant RNA Kit no se tiene buenas calidades de ARN. Tomando en cuenta la relación de absorbancia A260/280 solo las muestras CMP-H-001 y CMP-H-041 tienen un valor > 1.7 , inclusive la relación A260/230 de todas las muestras son < 1.5 , siendo concentraciones muy bajas, por lo que no fueron consideradas para ensayos posteriores. El Programa de control

de calidad de ácidos nucleicos (2020), detalla que, para tener un ARN de pureza óptima, su relación de absorbancias A260/280 debe estar entre 2.0 y 2.2, mientras que la A260/230 debe ser mayor que 2. Evidentemente, esto no sucede, es por ello que el aislamiento con kit no se consideró efectivo para este tipo de muestras. El método CTAB modificado tuvo mejores resultados, la relación A260/280 tanto de la muestra de tejido foliar como raíces están en el rango 2.0-2.2. Las absorbancias A260/230 para tejido foliar de 2 muestras (CMP-H-001, CMP-H-040) son 1.95 y 1.96 respectivamente, estos valores son cercanos a 2. Las accesiones CMP-H-001 y CMP-H-040 cumplen con los estándares señalados en el Programa de control de calidad de ácidos nucleicos (2020), considerándose ese ARN de buena calidad. Teniendo en cuenta lo anterior, solo la muestra de raíz de la accesión CMP-R-025 es considerada óptima, ya que su A260/230 > 1.8. En el caso de las accesiones CMP-R-040 y CMP-R-041, el valor de A260/230 fue de 1.60 y 1.70 respectivamente. Considerándose ARN aceptables sin embargo presentan contaminación de sales y fenoles. Tanto CMP-R-001 y CMP-R-008 tienen valores menores a 1.5 de A260/230 considerándose estos no aceptables, ya que el Programa de control de calidad de ácidos nucleicos (2020) señala que la A260/230 debe ser mayor a 1.5, sin embargo, se utilizó todos estos ARN para los siguientes ensayos de transcripción inversa y qPCR.

Aranda et al., 2012, señala que, es importante analizar la integridad del ARN previamente a la síntesis de ADNc para su uso posterior. En la electroforesis del gel de agarosa en todas las accesiones de banano se observan la presencia de ARN pequeños, además solo se visualiza una banda tenue 28S en cada una de las accesiones. La banda 18S al ser más pequeña es más susceptible a la degradación, es por eso que solo se logra visualizar bandas 28S, especialmente en las muestras FHIA-01 y FHIA-02 donde las bandas son más claras y la degradación del ARN en la parte inferior es más evidente. De la misma forma la banda 28S también se puede degradar, quedándonos solo ARN pequeños en la parte inferior (Figura 10 y 11). Según Kazantsev & Pace (2006), la presencia de las ribonucleasas (RNAsas) afectan directamente a la integridad del ARN. Dichas RNAsas

suelen ser secretadas por la piel y se están en diversos fluidos producidos por el cuerpo humano (Harder & Schroder, 2002). Aranda et al., 2012, señala que las RNAsas suelen estar activas a temperaturas de 15 y 80°C. La mejor manera de conservar los ARN es en congelación a -20°C y -80°C. Esta puede ser la razón de nuestros ARN degradados ya que, para su uso continuo se tuvo que pasar de temperaturas de -20°C a temperatura ambiente.

En el caso de la amplificación del control NTC en la qPCR, Collaghan & Fenech (2011), indican que puede ser debido a contaminación o formación de dímeros en los cebadores (primers). Tal y como se muestra en las figuras 14 y 17, no se observa ninguna banda en el carril 7 correspondiente al control NTC, mientras que en los carriles 2 a 6 que corresponden a las muestras (Orito, Ortaete 51, *Musa acuminata*, FHIA-01, FHIA-02) se observa una banda de 173 pb en el gel de agarosa de actina (ACT) y en el gel de agarosa de β -tubulina (TUBB) se observa una banda de 1110 pb. Debajo de cada banda se observa bandas muy tenues correspondientes a los dímeros. Entonces, se puede afirmar que en este caso los controles NTC representaban dímeros y no contaminación. Thornton & Basu (2015), afirman que el SYBER Green genera una señal fluorescente en contacto con cualquier secuencia de nucleótidos de doble cadena, es así que, existe la posibilidad de detectar señales falsas producidas por la presencia de dímeros. Los primers se consideran como productos no específicos, formados por la unión de monómeros. Suelen ser de cadena corta a diferencia de los ADN (Chauhan, 2019). Esto puede explicar porque los valores Ct de los controles NTC son menores de las reacciones que si tienen ADN.

En un estudio realizado por Zhang et al., 2016, se evaluaron varios genes candidatos de referencia para el análisis causado por el marchitamiento de Foc en *Musa* spp. Los genes evaluados (ACT2, ACT1, TUB) fueron estables, es decir que se pueden considerar como normalizadores. Indicando un nivel de expresión moderada con valores Ct entre 20 y 25. En nuestra investigación, los genes de referencia considerados fueron actina y β -tubulina (ACT3, TUBB). Tal y como se puede apreciar en la tabla 15 y 16, el nivel de expresión de los genes de referencia (Ct) es similar, teniendo un valor promedio de 23 para

TUBB y 29 para ACT3. Es así que, estos 2 genes de referencia pueden ser usados como normalizadores para este ensayo.

En la figura 18, la accesión FHIA-01 presenta el mayor nivel de expresión del gen RGA2 en tejido foliar, siendo esta accesión un cultivo tetraploide (AAAB), la cual ha sido desarrollada para generar tolerancia contra patologías. Según la tabla 4, a través de la información obtenida por el Diccionario de Colección de Musáceas de la EETP-INIAP, este cultivo FHIA-1 es tolerante ante Foc R4T. Así mismo, ProMusa (2020), cataloga a FHIA-1 como resistente a Foc R4. Siendo atribuible la tolerancia al alto nivel de expresión del gen RGA2 en tejido foliar de ese cultivar comparado al resto de bananos. Las diferencias de expresión del gen RGA2 empiezan a ser más notorias con la accesión Orito, ya que según la tabla 4, es diploide (AA) y es susceptible a Foc R4T. La susceptibilidad se puede atribuir entonces al nivel de expresión, ya que en este caso la accesión Orito se expresa 2 veces menos que la accesión FHIA-01. De igual forma, los cultivares Ortaete 51 y *Musa acuminata*, tienen un nivel de expresión del gen RGA2 en el tejido foliar 3 veces menor que la accesión FHIA-01. Según el Diccionario de Colección de las Musáceas, ambos cultivos son susceptibles a Foc R4T, siendo Ortaete 51 un banano triploide (AAA). García-Bastidas et al., 2022, señala que la mayoría de los cultivos triploides sigue siendo susceptible a Foc R4T. La expresión del gen RGA2 en tejido foliar que presenta una mayor diferencia en comparación con FHIA-01 es la accesión FHIA-02, este cultivar denominado tetraploide (AAAA) se expresa 10 veces menos que FHIA-01, sin embargo, a este cultivar FHIA-02 se lo describe como tolerante a Foc R4T (tabla 4). ProMusa (2017), señala al cultivo FHIA-02 como susceptible y extremadamente susceptible a Foc R4 y Foc R4ST, respectivamente. Atribuyéndose su susceptibilidad, al bajo nivel de expresión del gen RGA2 en la accesión FHIA-02.

Dale et al., 2017, señala que Foc R4T es un patógeno transmitido por el suelo, debido a ello es de gran importancia analizar la expresión génica de las raíces. En la figura 19, podemos visualizar que el nivel de expresión del gen RGA2 en las raíces de cada una de las accesiones de banano no presentan diferencias en comparación a la expresión del

gen de interés en el tejido foliar. La accesión Orito (AA), es aquella que presenta el mayor nivel de expresión del gen RGA2. Aunque la diferencia no es tan grande, Ortaete 51 y *Musa acuminata* presentan un nivel de expresión de RGA2 relativamente baja comparada con Orito. Estas 3 accesiones se consideran susceptibles a Foc R4T. De la misma forma los cultivos FHIA-01 (AAAB) y FHIA-02 (AAAA), son cultivos tetraploides que según la tabla 4, se consideran tolerantes a Foc R4T. Sin embargo, la expresión del gen de interés no presenta gran diferencia ya que es solo 2 veces menor a la expresión en la accesión Orito. Evidentemente son resultados diferentes comparado con los del tejido foliar, la expresión de genes puede ser regulada de forma diferente dependiendo del tejido, etapa de desarrollo o condiciones ambientales a las que se ve afectada. En el estudio realizado por Huang et al., 2016, el análisis de niveles de expresión es diferente en hojas que, en rizomas, dependiendo del tipo de función que cumpla dicho gen y en a qué condiciones se la presente. Existe la posibilidad que la expresión del gen RGA2 no tenga diferencias en las raíces de todas las acciones analizadas, ya que como se mencionó anteriormente, Foc R4T como primer paso ingresa por la raíz, razón por la cual no tiene un nivel de expresión diferente en ese tejido.

Se debe tener en cuenta que la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* es un tema ligado a una resistencia multifactorial, es decir dependerá de varios factores y no solo de un gen. Tal y como menciona León Alcívar (2022), existe un compendio de genes resistencia que pueden estar involucrados en diversas rutas metabólicas o procesos que generan resistencia contra Foc R4T. A pesar de esto, mediante esta investigación podemos comprobar como la expresión del gen RGA2 esta correlacionada en parte con la resistencia a Foc R4T especialmente a nivel de tejido foliar, tal y como se hizo en la investigación de Dale et al., 2017.

Conclusiones

Se identificó el mejor método para la obtención de ARN de buena calidad, siendo el método CTAB modificado el mejor para este fin, dando como resultados ARN de buena cantidad y

una calidad moderada, la cual se pudo verificar mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000c y geles de agarosa.

Se analizó la expresión de los genes de mantenimiento β - tubulina (TUBB) y actina (ACT3) como controles internos de qPCR, los cuales presentan un nivel de expresión génica (valor Ct) similar en cada accesión de banano, permitiéndonos de esta forma usarlo como normalizadores para el análisis del gen de interés RGA2.

Se cuantificó la expresión del gen RGA2 de las diferentes accesiones de banano del Banco de Germoplasma de la EETP-INIAP, donde no existen diferencias entre las muestras de raíz de las accesiones de banano, mientras que en el tejido foliar la expresión del gen RGA2 si presenta diferencias claras entre los cultivares.

Recomendaciones

Trabajar con muestras frescas en la extracción de ARN para obtener mejores resultados, siendo esto un paso fundamental para la obtención de ARN de buena calidad.

Realizar la ruptura celular de las raíces con un método diferente a la maceración con nitrógeno líquido o mediante un homogeneizador, debido a que las raíces presentan un tejido más fuerte y por ende la ruptura celular es más complicada.

Evaluar la expresión génica del resto de genes candidatos de banano analizados en la investigación previa, incluyendo las mismas accesiones de banano con las que se trabajó en este proyecto, con el fin de que sea posible realizar una comparación entre los diferentes genes.

Bibliografía

- AGROCALIDAD. (10 de Abril de 2021). *Ecuador cuenta con una red solvente para diagnóstico de FOC R4T*. Obtenido de <https://www.agrocalidad.gob.ec/ecuador-cuenta-con-una-red-solvente-para-diagnostico-de-foc-r4t/>
- Aguayo, J., Mostert, D., Fourrier-Jeandel, C., Cerf-Wendling, I., Hostachy, B., Viljoen, A., & Iloos, R. (2017). Development of a hydrolysis probe-based real-time assay for the detection of tropical strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. *PLOS ONE*, *12*(2), 1-20. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171767>
- Aranda, P., LaJoie, D., & Jorcyk, C. (2012). Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for Analyzing RNA Quality. *Electrophoresis*, *33*(2), 366-369. doi:10.1002/elps.201100335
- Arora, S., Steuernagel, B., Gaurav, K., Chandramohan, S., Long, Y., Matny, O., . . . Wulff, H. (2019). Resistance gene cloning from a wild crop relative by sequence capture and association genetics. *nature biotechnology*, *37*, 139-143. doi:<https://doi.org/10.1038/s41587-018-0007-9>
- AUGURA. (2019). *Augura intensificó medidas de control y prevención ante sospecha de presencia del hongo Fusarium R4T en Colombia alertado por el ICA*. Recuperado el 02 de Julio de 2023, de <https://www.augura.com.co/comunicaciones/noticias/boletin-augura-ante-alerta-fitosanitaria/>
- Bakry, F., & Horry, J. (2014). Advances in genomics: applications to banana breeding. *ISHS Acta Horticulturae 1114*, 171-180. doi:10.17660/ActaHortic.2016.1114.24
- Bashmil, Y., Ali, A., BK, A., Dunshea, F., & Suleria, H. (2021). Screening and Characterization of Phenolic Compounds from Australian Grown Bananas and Their Antioxidant Capacity. *Antioxidants (Basel)*, *10*(10), 1521. doi:10.3390/antiox10101521

Behind The Bench Staff. (11 de Marzo de 2022). *Trust your SYBR Green qPCR Data*.

Obtenido de <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/trust-your-sybr-green-qpcr->

[data/#:~:text=In%20a%20qPCR%20reaction%2C%20as,present%20in%20the%20original%20sample.](https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/trust-your-sybr-green-qpcr-data/#:~:text=In%20a%20qPCR%20reaction%2C%20as,present%20in%20the%20original%20sample.)

BIO-RAD Laboratories. (2006). Real time PCR. En *Applications Guide* (págs. 1-105).

Biosearch Technologies. (s.f.). *What is a no template control (NTC) well?* Recuperado el 17 de Agosto de 2023, de <https://www.biosearchtech.com/support/faqs/kasp-genotyping-assays/what-is-a-no-template-control-ntc-well>

Bio-tek, O. (2015). *E.Z.N.A.® Total RNA Kit I | Total RNA Extraction Kit*. Recuperado el 13 de Mayo de 2023, de <https://www.omegabiotek.com/product/total-cellular-rna-e-z-n-a-total-rna-kit-i/>

CABI. (16 de Noviembre de 2021). *Fusarium oxysporum f.sp. cubense (Panama disease of banana)*. Obtenido de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/24621>

Cedeño , G. (2010). *Evaluación del comportamiento de doce cultivares de Musa spp., Inoculados con Mycosphaerella fijiensis Morelet. Agente causal de la sigatoka negra*. Universidad Técnica de Manabí, Facultad de Ingeniería Agronómica , Portoviejo-Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/1285>

Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol*, 11, 113-116.

Chauhan, T. (15 de Abril de 2019). *What are Primer Dimers? – A Beginner's Guide*.

Obtenido de Genetic Education, PCR technology :

https://geneticeducation.co.in/what-are-primer-dimers-a-beginners-guide/#google_vignette

- Cheesman, E. (1948). Classification of the Bananas. III. Critical Notes on Species. b. *Musa acuminata* Colla. *Kew Bulletin* 1 (3): 17-28.
- Chen, A., Sun, J., Matthews, A., Armas-Egas, L., Cheng, N., Hamill, S., . . . Aitken, E. (2019). Assessing Variations in Host Resistance to *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* Race 4 in *Musa* Species, With a Focus on the Subtropical Race 4. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01062>
- COE Nacional. (23 de Junio de 2020). *Estrategia Nacional para la Prevención, Detección y Control de la Plaga Foc R4T*. Obtenido de <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2022/04/Estrategia-Nacional-de-Prevención-contra-Foc-R4T.pdf>
- Corporación Financiera Nacional. (27 de Agosto de 2021). *Ficha sectorial: Banano y Plátano*. Obtenido de Sugerencia de Análisis de Productos y Servicios: <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2021/fichas-sectoriales-3-trimestre/Ficha-Sectorial-Banano.pdf>
- D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J.-M., Baurens, F.-C., Carreel, F., Garsmeur, O., . . . Da Silva, C. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, 213–217. doi:<https://doi.org/10.1038/nature11241>
- D'Hont, A., Paget-Goy, A., Escoute, J., & Carreel, F. (2000). The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*, pages177–183. doi:<https://doi.org/10.1007/s001220050024>
- Dale, J., James, A., Paul, J.-Y., Khanna, H., Smith, M., Echeverria, S., . . . Harding, R. (14 de Noviembre de 2017). Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium* wilt tropical race 4. *Nature Communications*, 8(1496), 1-8. doi:<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01670-6>

- Domsch, K., Gams, W., & Anderson, T.-H. (1980). *Compendium of soil fungi* (Vol. 2). London: Academic Press.
- FAO. (2017). *Global programme on banana Fusarium wilt disease: Protecting banana production from the disease with focus on*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i7921e.pdf>
- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola . (28 de Julio de 2023). *Banano FHIA-01* . Obtenido de Banano rústico para huertos caseros y para procesamiento: http://www.fhia.org.hn/descargas/Programa_de_Banano_y_Platano/hibridos-FHIA/fhia-01.pdf
- García-Bastidas, F., Arango Isaza, R., Rodríguez-Cabal, H., Seidl, M., Cappadona, G., Segura, R., . . . J. Kema , G. (21 de Septiembre de 2022). Induced resistance to Fusarium wilt of banana caused by Tropical Race 4 in Cavendish cv Grand Naine bananas after challenging with avirulent Fusarium spp. *Plos One*, 17(9). doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273335>
- Ghag, S., Shekhawat, U., & Ganapathi, T. (2015). Fusarium wilt of banana: biology, epidemiology and management. *International Journal of Pest Management*, 61(3), 250-263. doi:<https://doi.org/10.1080/09670874.2015.1043972>
- Harder, J., & Schroder, J.-M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*, 277(48), 46779–46784. doi:[10.1074/jbc.M207587200](https://doi.org/10.1074/jbc.M207587200)
- Huang, Q., Huang, X., Deng, J., Liu, H., Liu, Y., Yu, K., & Huang*, B. (30 de Marzo de 2016). Differential Gene Expression between Leaf and Rhizome in *Atractylodes lancea*: A Comparative Transcriptome Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 7. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00348>

- Kazantsev, A., & Pace, N. (2006). Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Microbiol*, 4(10), 729-740. doi:10.1038/nrmicro1491
- León Alcívar, B. (22 de Febrero de 2022). *Aplicación de la minería genómica en banano para la búsqueda de genes de resistencia a Fusarium oxysporum*. Obtenido de Universidad Regional Amazónica Ikiam:
http://repositorio.ikiam.edu.ec/jspui/handle/RD_IKIAM/630
- Li, C., Zuo, C., Deng, G., Kuang, R., Yang, Q., Hu, C., . . . Yi, G. (2013). Contamination of Bananas with Beauvericin and Fusaric Acid Produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *PLOS ONE*, 8(7), 1-11. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070226
- Li, C.-Y., Deng, G.-M., Yang, J., Viljoen, A., Jin, Y., Kuang, R.-B., . . . Yi, G.-J. (2012). Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. *BMC Genomics*, 5(13), 374. doi: 10.1186/1471-2164-13-374
- Li, H., Dong, Z., Ma, C., Tian, X., Xiang, Z., Xia, Q., . . . Liu, W. (2019). Discovery of powdery mildew resistance gene candidates from *Aegilops biuncialis* chromosome 2Mb based on transcriptome sequencing. *PLOS ONE*, 14(11), 1-19.
doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220089
- Logemann, J., Schell, J., & Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem*, 163(1), 16-20. doi:10.1016/0003-2697(87)90086-8
- Magdama, F. (2019). *Fusarium oxysporum*-El Hongo mas temido en la Industria del Banano. *ECUADOR ES CALIDAD. Revista ecuatoriana científica*, 6, 1-4.
- 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), 1-19.

- Martinez Solorzano, G., Rey Brina, J., Pargas Pichardo, R., & Manzanilla, E. (2020). Fusarium wilt by tropical race 4: Current status and presence in the American continent. *Agronomía Mesoamericana*, 31(1), 1-18. doi:10.15517/am.v31i1.37925
- Maryani, N., Lombard, L., Poerba, Y., Subandiyah, S., Crous, P., & Kema, G. (2019). Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense in the Indonesian centre of origin. *Stud Mycol*, 155-194. doi:10.1016/j.simyco.2018.06.003.
- Mészáros, É. (11 de Mayo de 2022). *qPCR: How SYBR® Green and TaqMan® real-time PCR assays work*. Obtenido de <https://www.integrabiosciences.com/japan/en/blog/article/qpcr-how-sybr-green-and-taqman-real-time-pcr-assays-work>
- Monzón , A., & Rodriguez Tudela, J. (2000). Infecciones causadas por el género *Fusarium*. *Control Calidad SEIMC*, 1-6.
- Orjeda , G. (1998). *Evaluation of Musa germplasm for resistance to Sigatoka diseases and Fusarium wilt*. IPGRI/INIBAP.
- Peraza-Echeverria, S., Dale, a., Harding, R., Smith, M., & Collet, C. (2008). Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4. *Molecular Breeding*, 22, 565–579. doi:<https://doi.org/10.1007/s11032-008-9199-x>
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F., . . . Denham, T. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11311-11318. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1102001108>

- Ploetz, R. (2005). Panama Disease: An Old Nemesis Rears its Ugly: Head Part 2. The Cavendish Era and Beyond. *APS Publications*, 7(1). doi:<https://doi.org/10.1094/PHP-2006-0308-01-RV>
- Ploetz, R. (2006). Fusarium Wilt of Banana Is Caused by Several Pathogens Referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*, 96(6), 653-656.
doi:10.1094/PHYTO-96-0653
- Ploetz, R., & Pegg, K. (1999). Fusarium wilt. Diseases of Banana, Abaca and Enset. *CABI Publishing*, 143-159.
- Pocasangre, L., Quesada, L., & Brown, D. (2009). Reunion de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de *Fusarium*, BBTV y otras Plagas de Musaceas para la Region del OIRSA, America Latina y el Caribe: Documentos de programa y resúmenes de la Reunion OIRSA Sede Central, San Salvador, El S. *CGIAR: Repository of Agricultural Research Outputs*, 72.
- Podevin, N., Krauss, A., Henry, I., Swennen, R., & Remy, S. (2012). Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop *Musa*. *Molecular Breeding*, 30, 1237–1252.
doi:<https://doi.org/10.1007/s11032-012-9711-1>
- Portal González, N., Solano Gaybor, J., & Santos Bermúdez, R. (2017). Enfoques moleculares para la resistencia del banano a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. Parte II. *Revista científica multidisciplinar Investigación y Saberes*, 6(2), 1-21.
- Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. (Octubre de 2020). *Banco Nacional de ADN*. Obtenido de <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- ProMusa. (25 de Julio de 2017). *FHIA-02*. Obtenido de <https://www.promusa.org/FHIA-02>
- ProMusa. (16 de Julio de 2020). *FHIA-01*. Obtenido de <https://www.promusa.org/FHIA-01>

- Ritter, E., Aragonés, A., Ruiz de Galarreta, J., Hernández, M., & Barandalla, L. (2020). *Mapeo por asociación para detectar genes candidatos de tolerancia a estreses abióticos en papa*. Obtenido de VII Congreso Ecuatoriano de la Papa: <https://cipotato.org/wp-content/uploads/2017/08/2.-Eritter.pdf>
- Savedra Gallo, C. (2012). *Identificación de Genes Candidatos de Resistencia a Sigatoka Negra en Variedades de Banano y Plátano*. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral .
- SENASICA. (2018). *Protocolo de Diagnóstico: Fusarium oxysporum f. sp. cubense Raza 4 Tropical (Marchitez por Foc R4T)*. Tecámac: SAGARPA.
- Silva, F. J. (2004). Estudio de genes candidatos en la susceptibilidad y curso clínico del lupus eritematoso sistémico. *Dialnet*, 1-18.
- Soto, M. (1990). .Bananos cultivo y comercialización. En *Segunda edición* (pág. 619). Costa Rica: Ed. Lil s.a. San Jose.
- Stover, R., & Ploez, R. (1990). Fusarium wilt of banana: some history and current status of the disease. *APS Press*, 1-7.
- Summerell, B. (2019). Resolving Fusarium: Current Status of the Genus. *Annu Rev Phytopathol*, 323-339. doi:10.1146/annurev-phyto-082718-100204
- Thornton, B., & Basu, C. (2015). Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design. *Methods in Molecular Biology*, 173-179. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_13
- Waite, B., & Stover, R. (1960). Studies on Fusarium wilt of bananas. VI. Variability and cultivar concept in *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. *Canadian Journal of Botany*, 38(6), 985-994. doi:10.1139/b60-087
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., & Levine, M. (2004). *Molecular Biology of the Gene, Books a la Carte Edition*. San Francisco: Pearson.

- White, E., Venter, M., Hiten, N., & Burger, J. (2008). Modified Cetyltrimethylammonium bromide method improves robustness and versatility: The benchmark for plant RNA extraction. *Biotechnology Journal*, 3, 1424-1428. doi:10.1002/biot.200800207
- Wuyts, N., De Waele, D., & Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.06.005>, 44(5-6), 308-314.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.06.005>
- Zhang, L., Liu, L., Cheng, P., Shen, H., Rong, B., Liu, W., & Yu, G. (2017). Identification and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in banana (*Musa* spp.) under *Fusarium* wilt resistance induction conditions. *Journal of Phytopathology*, 165(11), 746-754. doi:<https://doi.org/10.1111/jph.12614>
- Zhu, M., & Zhao, S. (2007). Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. *International Journal of Biological Sciences*, 3(7), 1-8.
doi:10.7150/ijbs.3.420