

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

**“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”**

Autor: Anaguano Peralta, Alexis Mauricio

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

Sangolquí, 04 de septiembre 2023

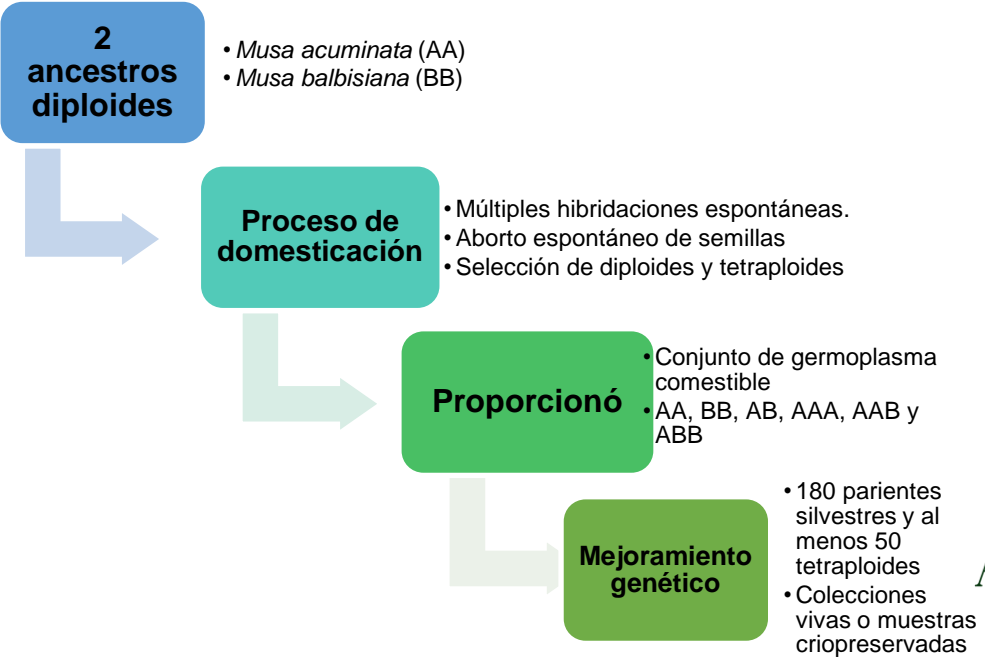


- 1** Introducción
- 2** Objetivos
- 3** Hipótesis
- 4** Materiales y Métodos
- 5** Resultados y Discusión
- 6** Conclusiones
- 7** Recomendaciones
- 8** Agradecimientos



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

Banano



Hierbas gigantes y no árboles

3 metros de altura (sin tallo)

Familia: *Musaceae*



INTRODUCCIÓN

Enfermedades



Mycosphaerella musae



Fusarium spp.



AEBE

- Exportaciones de banano movilizaron 133,13 millones de cajas entre enero y abril de 2023.
- USD 6,50 precio mínimo de sustentación para la caja de banano

Pérdida por Foc

- Para el año 2020, la producción cayó en 9% y la superficie cosechada disminuyó en 12% frente al año 2019

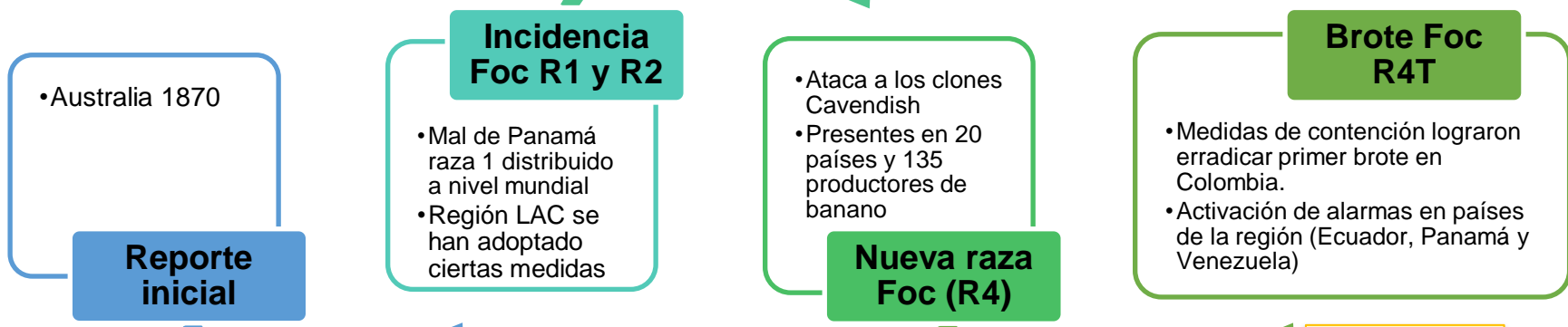
Económico

- Banano es uno de los principales productos de exportación por el Ecuador al mundo,

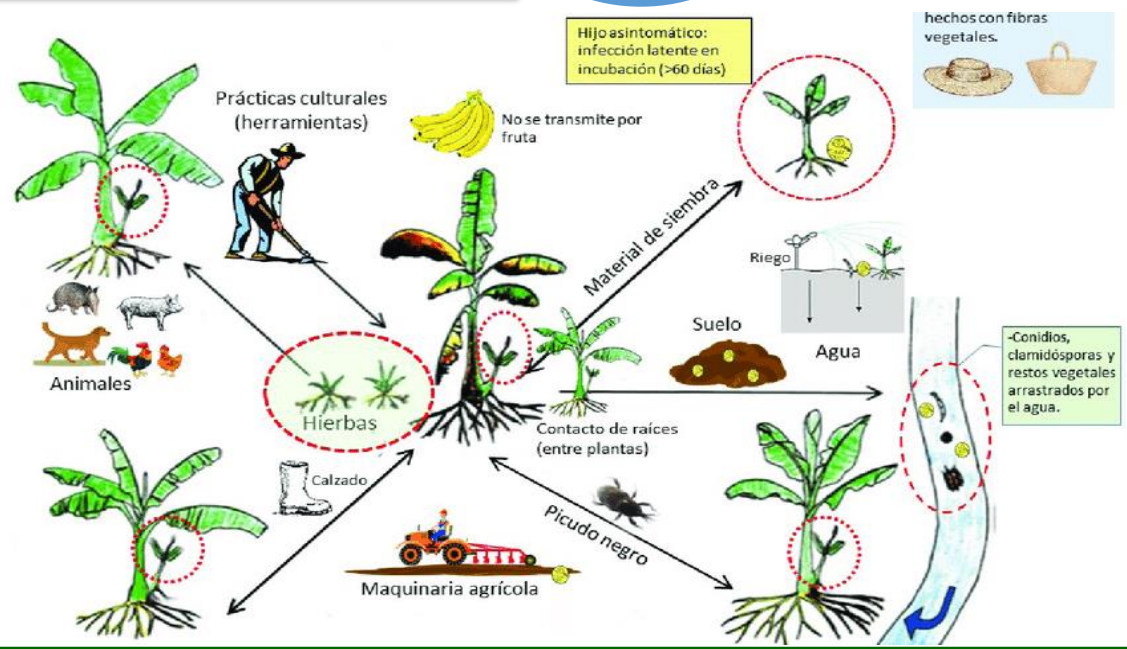
“Evaluación de la expresión del gen RGA2 de banana asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cabense* presente en el Banco de Germoplasma de Banano de la EETP-INIAP”

Fusarium oxysporum f.sp. *cabense*

INTRODUCCIÓN



Medios y mecanismos de dispersión

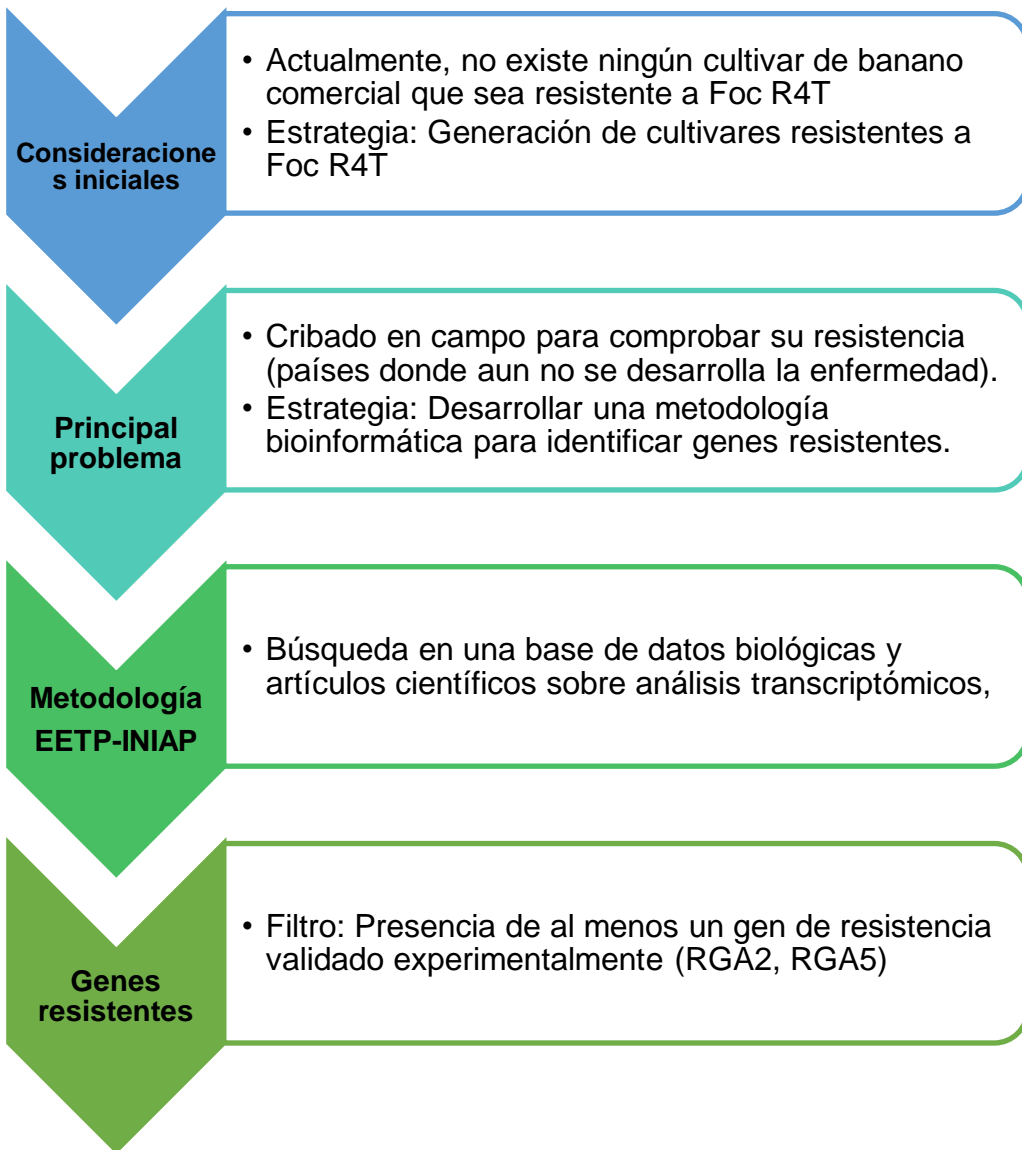


Patogenia



(Bancroft, 1876; Maryani *et al.*, 2018; Stover, 1962; Ploetz, 2006; Pocasangre *et al.*, 2009; FAO, 2017; AUGURA, 2019; Stover & Ploetz, 1990; Li *et al.*, 2012; COE Nacional, 2020)

“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”

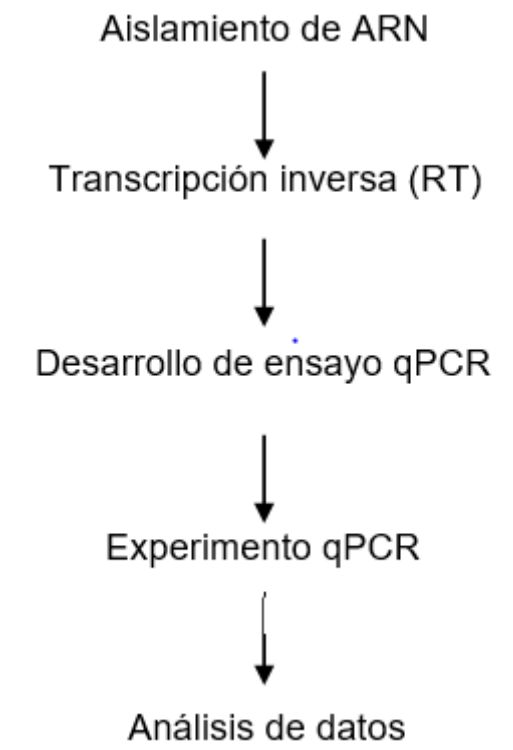


Nucleotide database interface showing search results for RGA2 and associated candidate genes.

Genes de resistencia	Genes candidatos asociados a la resistencia
<ul style="list-style-type: none"> RGA2 RGA5 	<ul style="list-style-type: none"> PR1 CHS RIN4 RPM1 RPS2 WRKY22 NPR1 TGA4 PAL

INTRODUCCIÓN

Flujo de trabajo para análisis de expresión génica



- 1 Introducción
- 2 **Objetivos**
- 3 Hipótesis
- 4 **Materiales y Métodos**
- 5 **Resultados y Discusión**
- 6 Conclusiones
- 7 Recomendaciones
- 8 Agradecimientos

Objetivo general

Evaluar 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.

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.

- 1 Introducción
- 2 Objetivos
- 3 Hipótesis**
- 4 Materiales y Métodos
- 5 Resultados y Discusión
- 6 Conclusiones
- 7 Recomendaciones
- 8 Agradecimientos



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

- 1 Introducción
- 2 Objetivos
- 3 Hipótesis
- 4 Materiales y Métodos**
- 5 Resultados y Discusión
- 6 Conclusiones
- 7 Recomendaciones
- 8 Agradecimientos



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

Muestreo



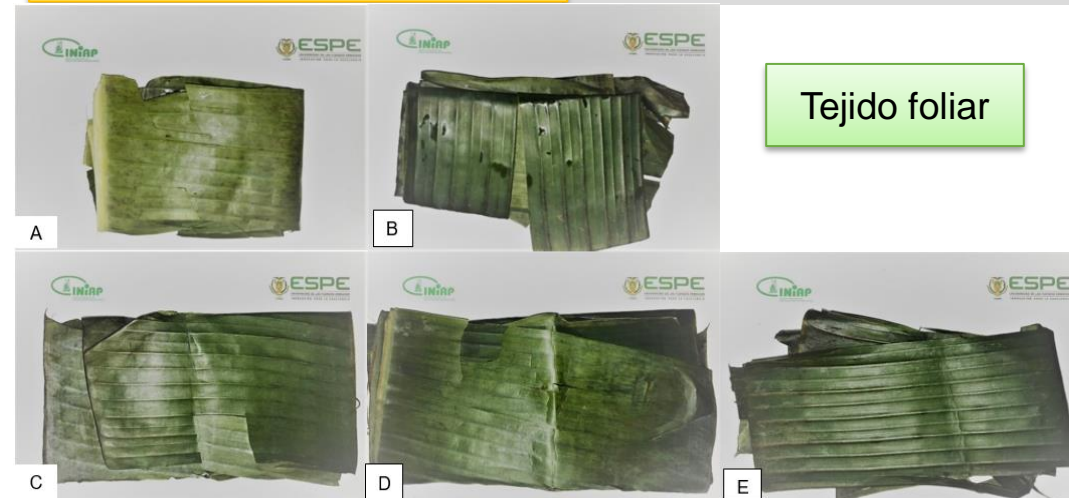
FASE DE CAMPO



Procesamiento de la muestra

MATERIALES Y MÉTODOS

Tejido foliar



A) Orito; B) Ortaete 51; C) *Musa acuminata*; D) FHIA-01; E) FHIA-02.

Raíz



A) Orito; B) Ortaete 51; C) *Musa acuminata*; D) FHIA-01; E) FHIA-02.

A) Orito; B) Ortaete 51; C) *Musa acuminata*; D) FHIA-01; E) FHIA-02.

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



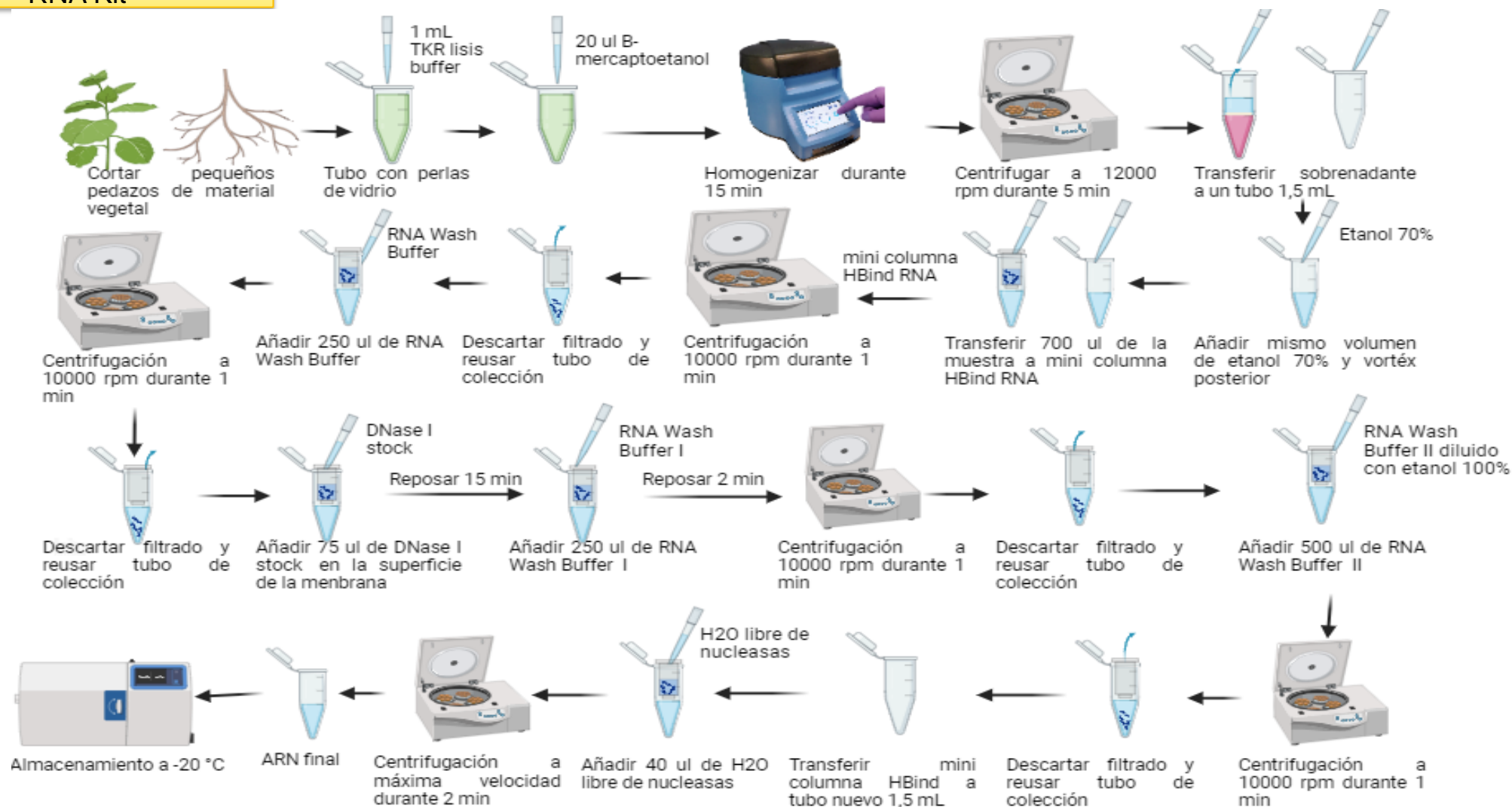
ESPE
 ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
 CAMINO A LA EXCELENCIA

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

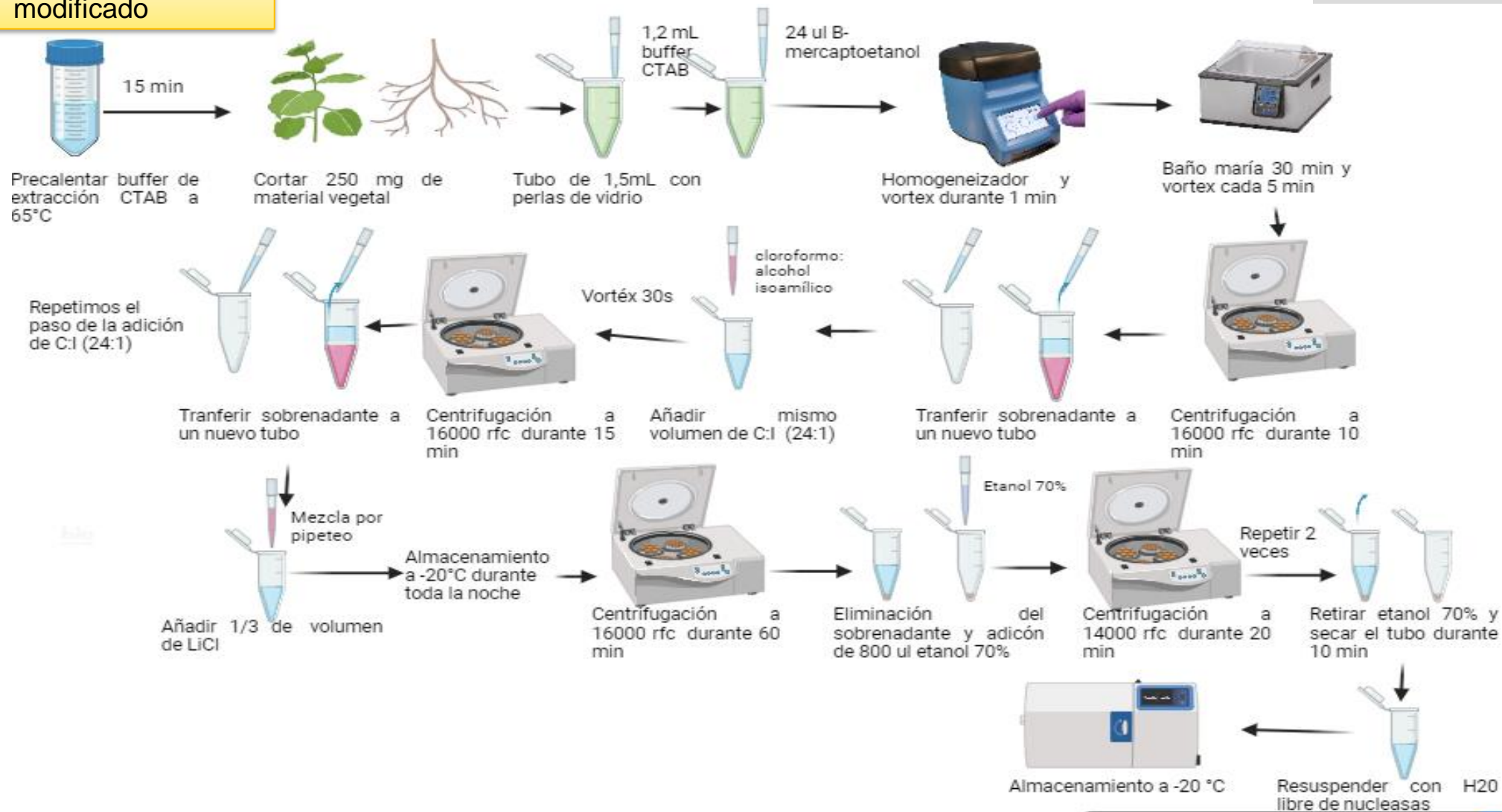
Extracción método E.Z.N.A
RNA Kit

FASE DE LABORATORIO

MATERIALES Y MÉTODOS



Extracción método CTAB modificado



Análisis de calidad y cantidad de ARN

Retrotranscripción

invitrogen

SuperScript™ III Reverse Transcriptase

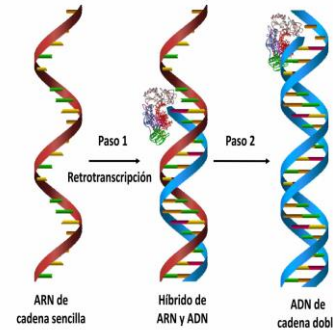
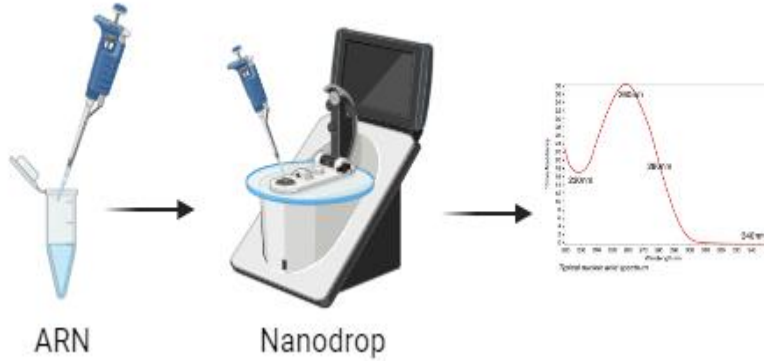
Componentes iniciales.

Reactivo	Concentración	Cantidad (µL)
oligo(dT) ₂₀	50 µM	1
dNTP Mix	10 mM	1
H ₂ O	-	9
ARN	-	2
		13

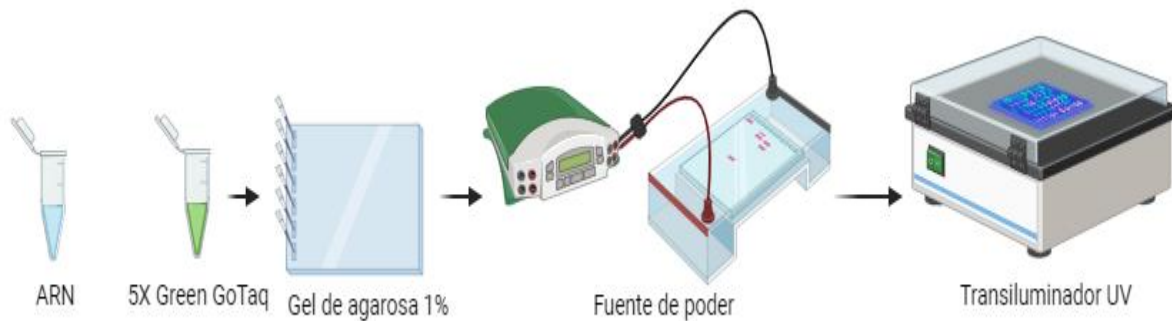
Master mix para la síntesis de ADNc a partir del ARN molde.

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

1



2



“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”

Desarrollo de ensayos qPCR

appliedbiosystems

PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix

Configuración de reacciones PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

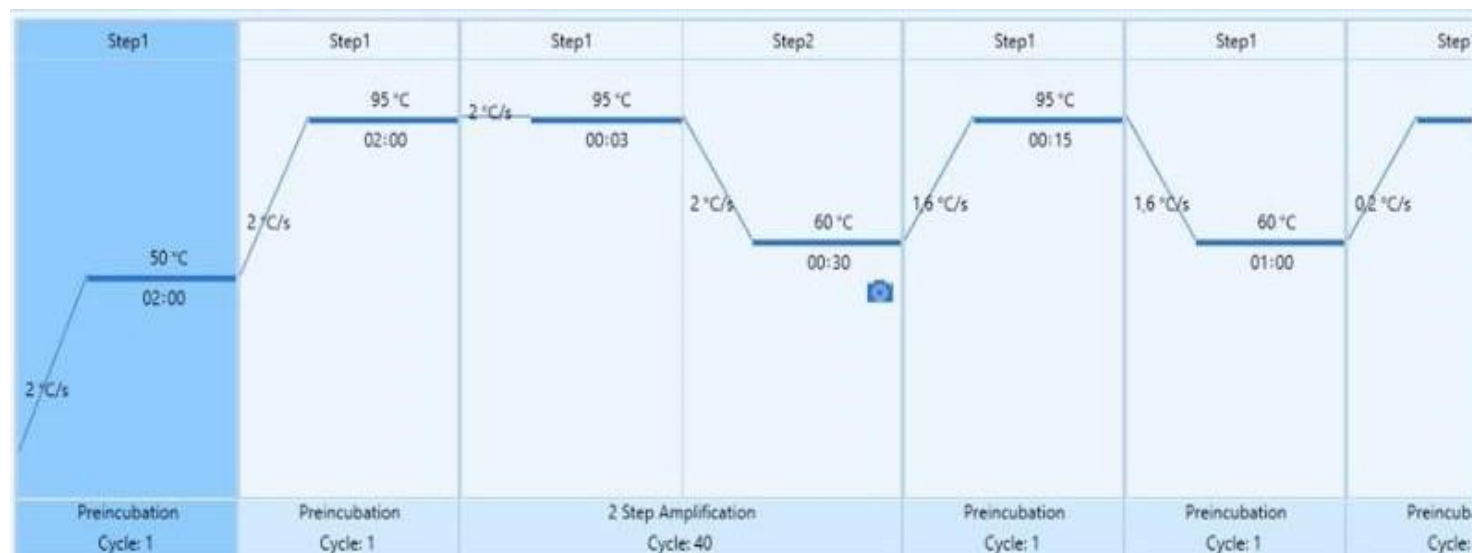
Componentes	Cantidad (µL/pocillo)
PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix	5
Forward	0,5
Reverse	0,5
H ₂ O	3
ADN	1
Total	10

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	

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



- 1 Introducción
- 2 Objetivos
- 3 Hipótesis
- 4 Materiales y Métodos
- 5 Resultados y Discusión**
- 6 Conclusiones
- 7 Recomendaciones
- 8 Agradecimientos



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

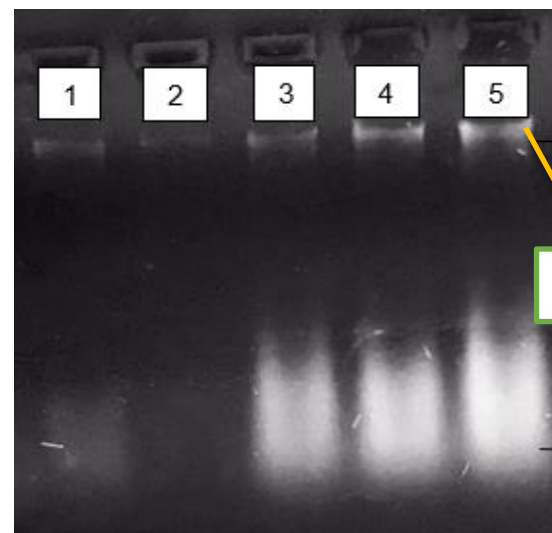
Cantidad y Calidad de ARN obtenido

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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
	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

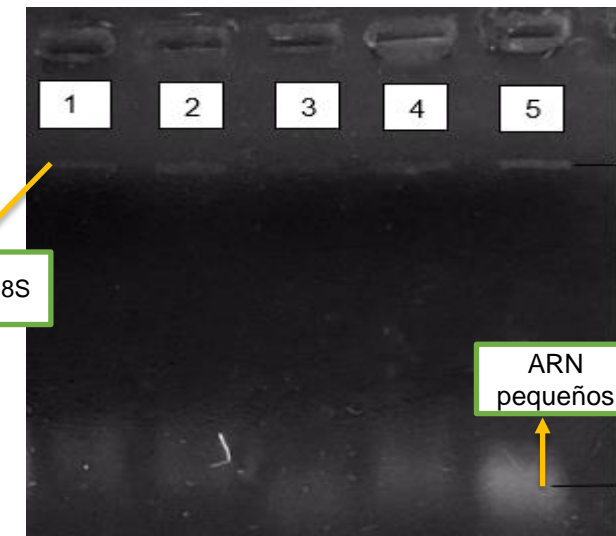
CMP-H: Muestra hoja; CMP-R: Muestra raíz

Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN de tejido foliar



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

Electroforesis en gel de agarosa 1% del ARN de raíz



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

Retrotranscripción

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
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

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

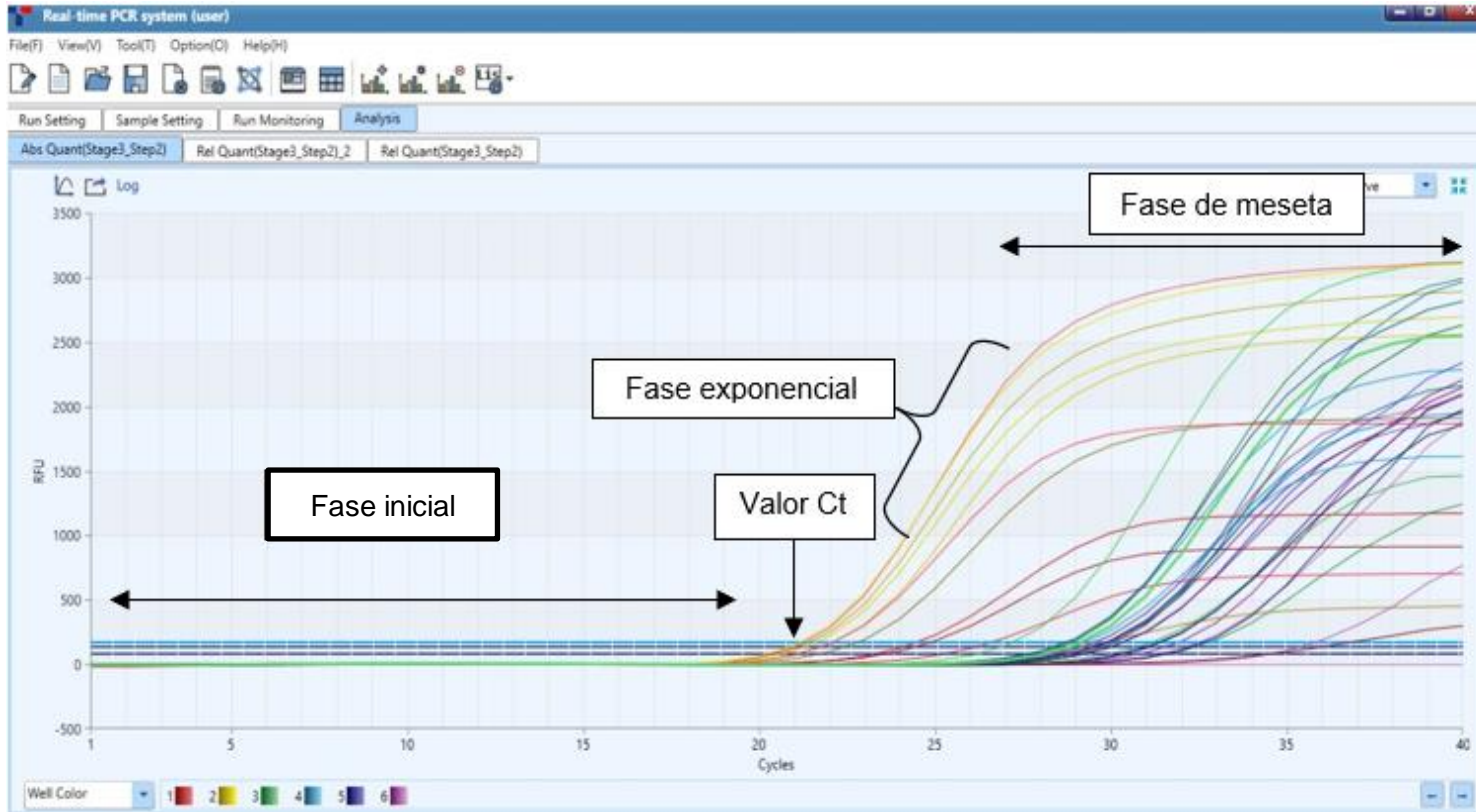
CMP-H: Muestra hoja; CMP-R: Muestra raíz

“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”

Ensayos de qPCR tejido foliar

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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.

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

Gen	Muestra	Valor Ct	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
Actina (ACT3)	Orito	29,816	28,520
	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
	<i>Musa acuminata</i>	31,441	31,980
	FHIA-01	30,418	29,559
	FHIA-02	29,910	35,824
	NTC	-	32,566

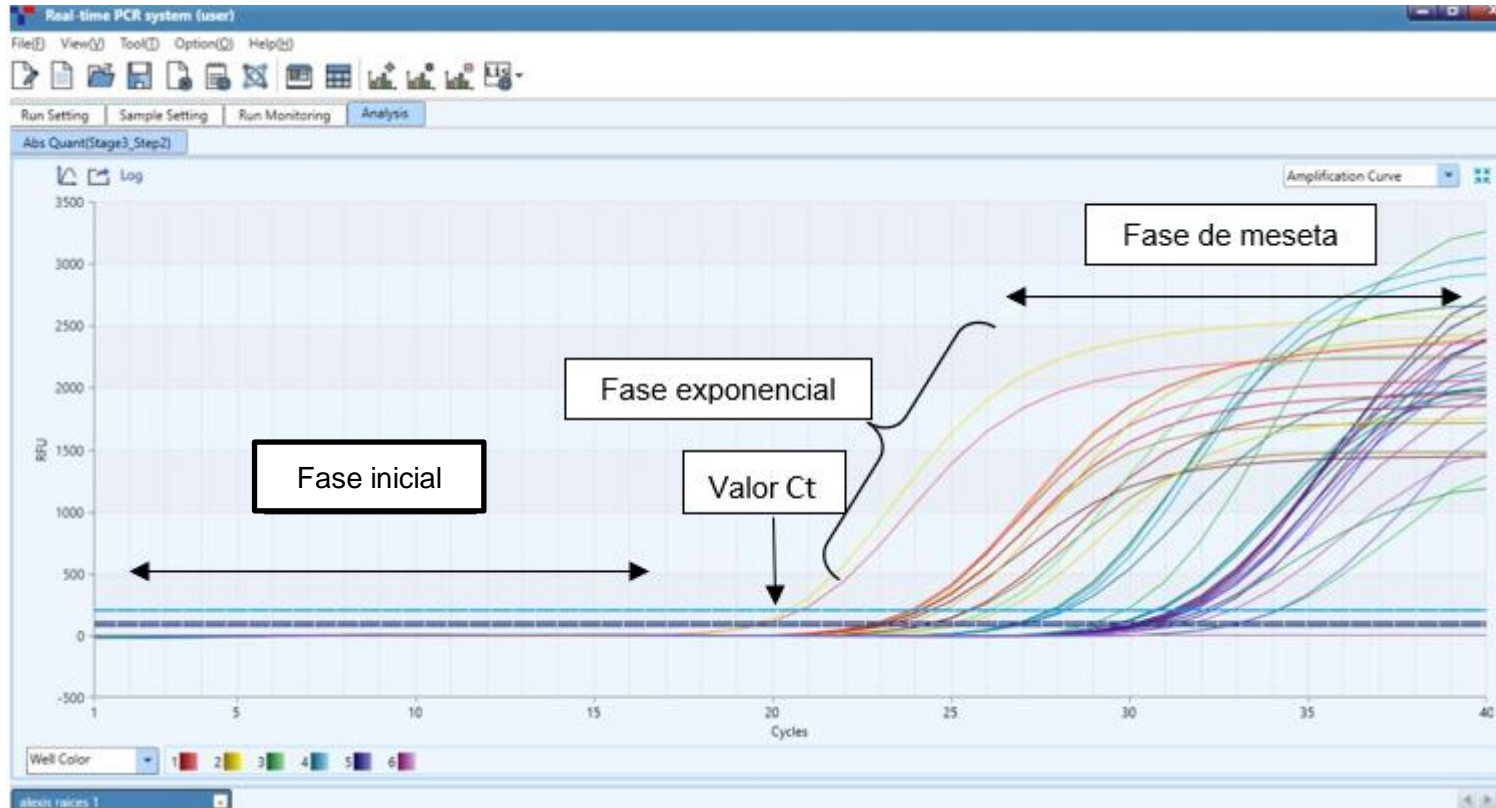


“Evaluación de la expresión del gen RGA2 de banano asociado a la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *cabense* presente en el Banco de Germoplasma de Banano de la EETP-INIAP”

Ensayos de qPCR en raíz

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

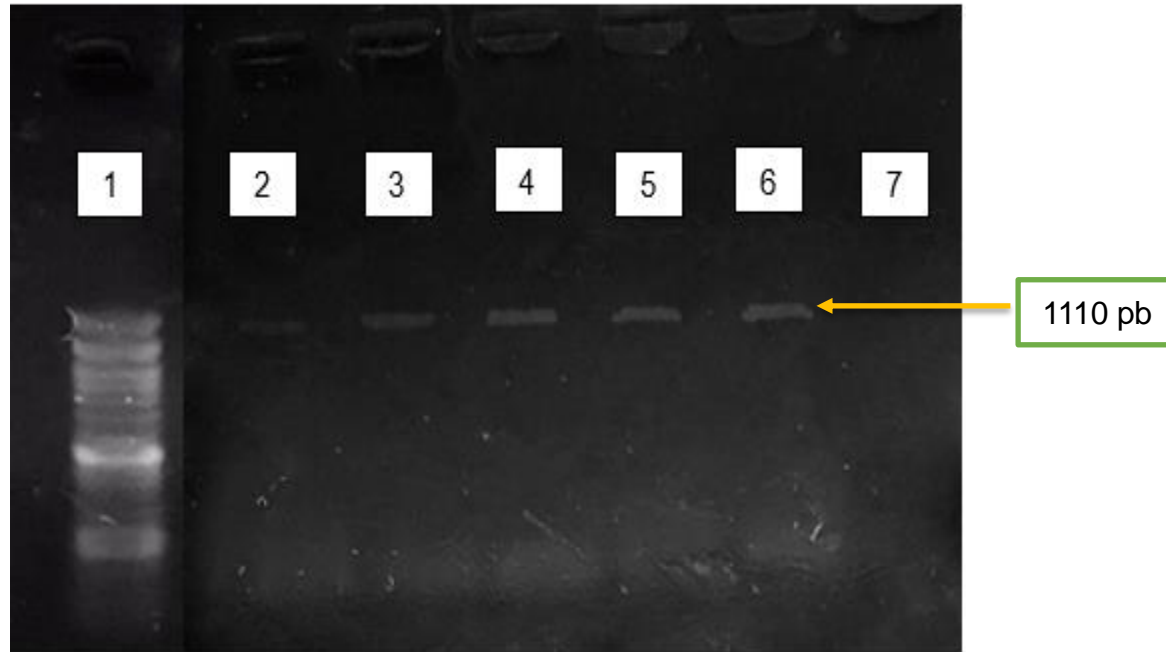


Nota. Curvas rojas y amarillas: Gen TUBB; Curvas verdes y celestes: Gen ACT3; Curvas azules y violetas: Gen RGA2.

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

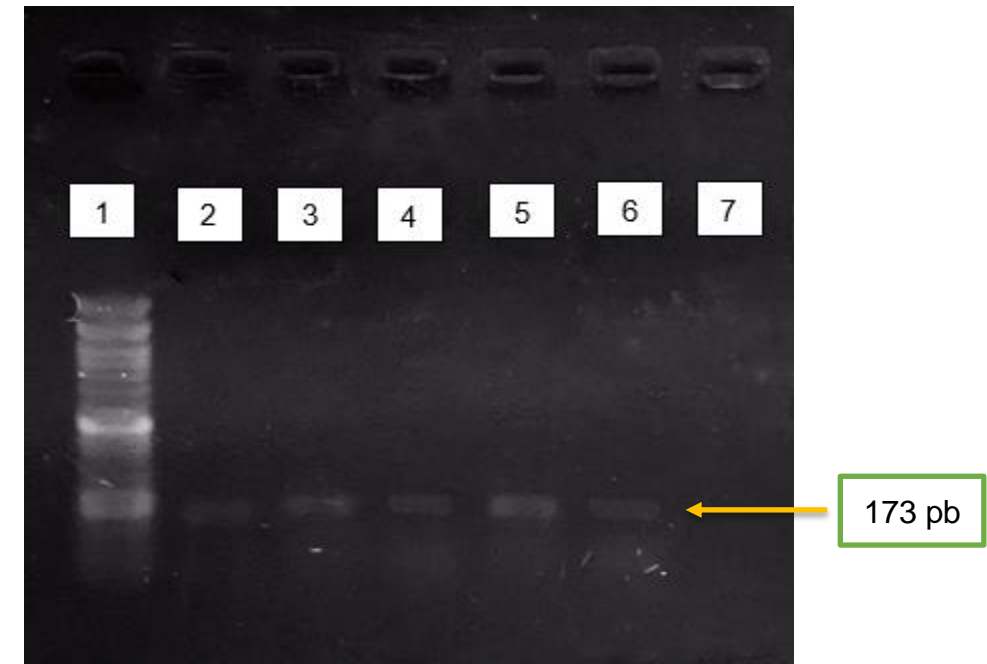
Gen	Muestra	Valor Ct	Valor Ct
β-tubulina (TUBB)	Orito	23,004	24,082
	Ortaete 51	24,137	22,637
	Musa acuminata	22,824	22,645
	FHIA-01	22,527	23,465
	FHIA-02	22,590	25,051
	NTC	19,574	19,348
Actina (ACT3)	Orito	27,004	30,309
	Ortaete 51	29,840	27,277
	Musa acuminata	31,027	29,926
	FHIA-01	29,113	29,824
	FHIA-02	33,191	27,137
	NTC	25,301	27,277
RGA2	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	-

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



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).

Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de qPCR de las muestras de raíz con el gen actina (ACT3).



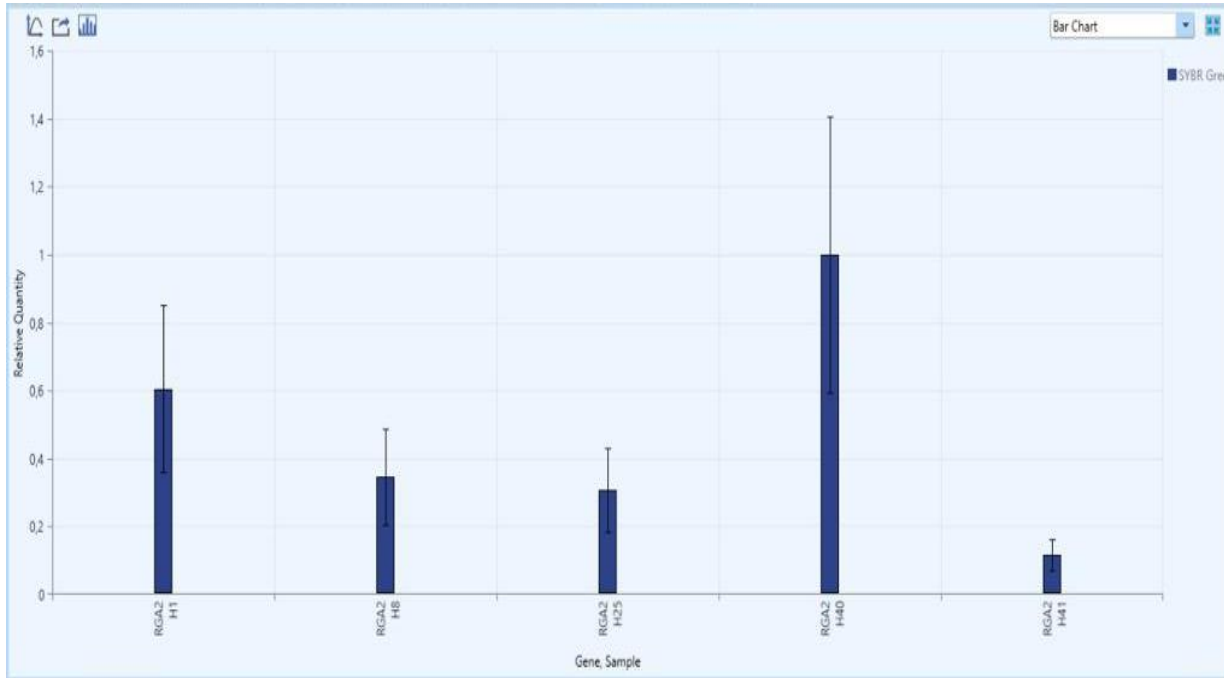
Nota. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Orito, Carril 3: Ortaete 51, Carril 4: *Musa acuminata*, Carril 5: FHIA-01, Carril 6: FHIA-02, Carril 7: NTC (Control negativo).

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

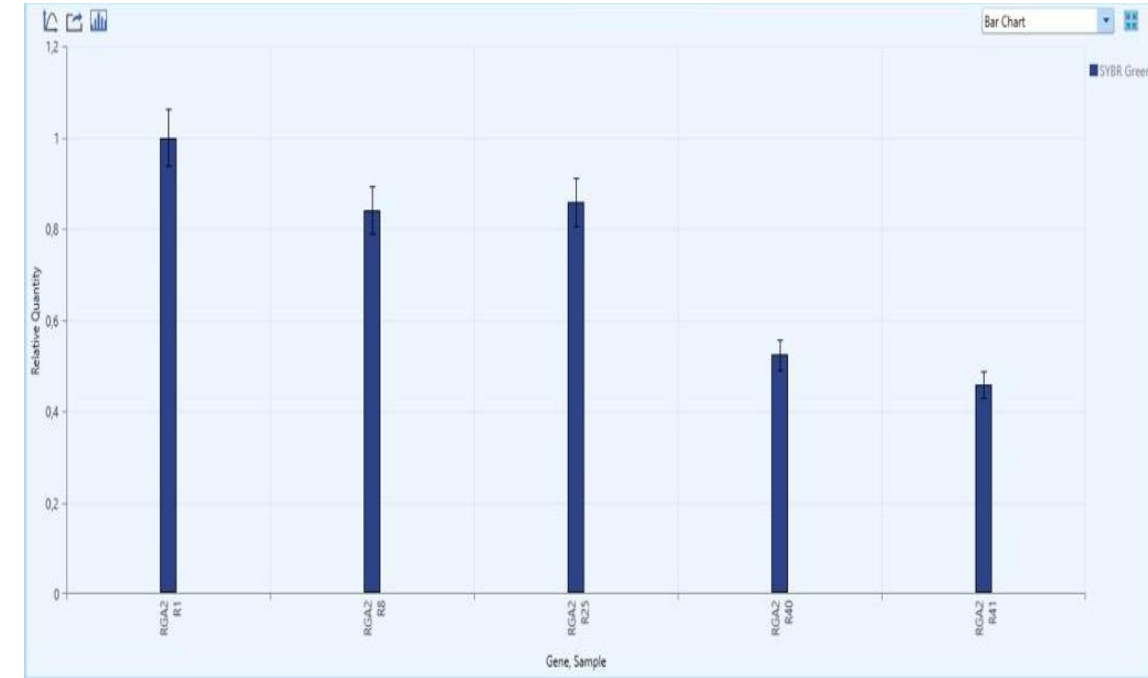
Análisis de datos qPCR

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de expresión génica del gen RGA2 en tejido foliar



Análisis de expresión génica del gen RGA2 en raíz



Orito (AA)

Ortaete 51(AAA)

Musa acuminata (AA)

FHIA-01 (AAAB)

FHIA-02 (AAAA)

Orito (AA)

Ortaete 51(AAA)

Musa acuminata (AA)

FHIA-01 (AAAB)

FHIA-02 (AAAA)

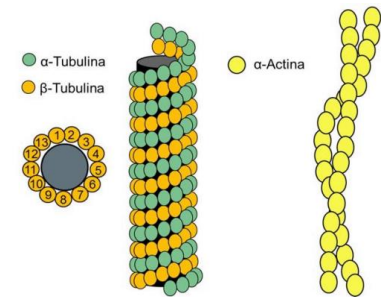
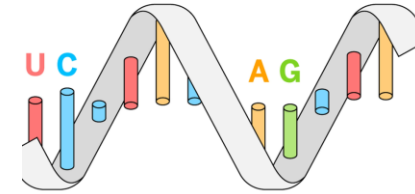


- 1 Introducción
- 2 Objetivos
- 3 Hipótesis
- 4 Materiales y Métodos
- 5 Resultados y Discusión
- 6 Conclusiones**
- 7 Recomendaciones
- 8 Agradecimientos



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.

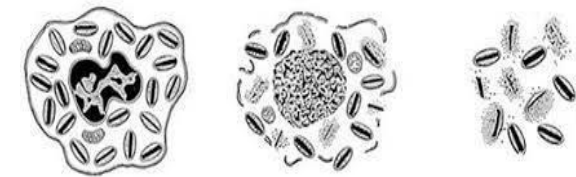


- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos**
- 3 **Hipótesis**
- 4 **Materiales y Métodos**
- 5 **Resultados y Discusión**
- 6 **Conclusiones**
- 7 **Recomendaciones**
- 8 **Agradecimientos**



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.



Genes de resistencia	Genes candidatos asociados a la resistencia
• RGA2	• PR1
• RGA5	• CHS
	• RIN4
	• RPM1
	• RPS2
	• WRKY22
	• NPR1
	• TGA4
	• PAL

- 1 **Introducción**
- 2 **Objetivos**
- 3 **Hipótesis**
- 4 **Materiales y Métodos**
- 5 **Resultados y Discusión**
- 6 **Conclusiones**
- 7 **Recomendaciones**
- 8 **Agradecimientos**





Ing. Francisco Flores Ph.D
Director del proyecto

Antonio Bustamante Ph.D
Investigador, Instituto Nacional de
Investigaciones Agropecuarias (INIAP)



Laboratorio Diagnóstico Molecular IDgen



FAMILIA Y AMIGOS

