



**UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM**

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

***Aplicación de la minería genómica en banano para la  
búsqueda de genes de resistencia a Fusarium oxysporum***

Borys Alexander León Alcívar

Tena, febrero 2022

Napo, Ecuador

## **Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad**

Tena, 22 de febrero de 2022

Yo, Borys Alexander León Alcívar con documento de identidad N° 2300271760, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:

---

Borys Alexander León Alcívar

## **Certificado de dirección de trabajo de integración curricular**

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado “Aplicación de la minería genómica en banano para la búsqueda de genes de resistencia a *Fusarium oxysporum*”, en la modalidad de proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por Borys Alexander León Alcívar, bajo nuestra dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 22 de febrero de 2022

Firma:

Ery Odette Fukushima  
C.I: 1759301714

Firma:

Antonio Bustamante González  
C.I: 1205594110

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor, el Dr. Antonio Bustamante, por sus mentorías y dedicación mientras desarrollaba mi trabajo de titulación.

Al Dr. Iván Garzón, por brindarme su apoyo y permitirme ingresar al Laboratorio de Biología Molecular en la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP – INIAP).

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por brindarme todas las facilidades para desarrollar mi trabajo de titulación en sus instalaciones.

A mi tutora, la Dra. Ery Fukushima, por el tiempo dedicado y los conocimientos brindados durante todo este tiempo.

A la Universidad Regional Amazónica Ikiam y todos quien conforman la comunidad universitaria por formarme como profesional y persona.

A todos mis familiares y amigos que me han acompañado durante mi vida universitaria.

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mis abuelitos que siempre me brindaron su cariño incondicional y apoyo en todo momento, a pesar de todas las adversidades.

A mi madre María Alcívar, mi padre Boris León y mi hermano Bryan León, que han sido mi fuente de inspiración. Gracias por todos los consejos brindados, los valores que me han inculcado desde niño y por apoyarme en todas las decisiones que he tomado.

A aquella señorita que conocí durante el desarrollo de este trabajo y que me ha motivado a seguir adelante. Gracias por creer en mi desde un principio y ser mi apoyo emocional en esta etapa de mi vida.

## ÍNDICE GENERAL

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad .....	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE GENERAL.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT .....	xi
INTRODUCCIÓN .....	13
MÉTODOS .....	16
Librería de genes asociados a resistencia contra <i>Fusarium sp.</i> .....	17
Búsqueda genes reportados como resistentes a <i>Fusarium sp.</i> en los genomas de banano.....	18
Genes de resistencia contra FOC R4T presente en el genoma de banano ( <i>Musa sp.</i> ) ...	19
Diseño y síntesis de cebadores.....	19
Extracción de ADN .....	20
Amplificación por PCR y visualización de resultados .....	21
Análisis de las rutas metabólicas de los genes de resistencia.....	21
RESULTADOS.....	21
Búsqueda de genes de resistencia contra <i>F. oxysporum</i> .....	21
Amplificación por PCR de genes de resistencia.....	24
DISCUSIÓN .....	26
Búsqueda de genes de resistencia contra <i>F. oxysporum</i> .....	26
Análisis de las rutas metabólicas de los genes de resistencia.....	27
Indagación de los genes de resistencia en accesiones de banano.....	30
CONCLUSIONES.....	32
REFERENCIAS .....	33
ANEXOS.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Lista de genes de resistencia contra FOC R4T presentes en el genoma de banano ( <i>Musa</i> sp.) (Lista D).....	23
<b>Tabla 2.</b> Genes de resistencia contra FOC presente en el genoma de diversas variedades de banano ( <i>Musa</i> sp.) .....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Flujo de trabajo para la búsqueda de genes de resistencia contra FOC R4T presentes en el genoma de banano ( <i>Musa</i> sp.) .....	17
<b>Figura 2.</b> Sección de la hoja utilizada para la extracción de ADN .....	20
<b>Figura 3.</b> Distribución de las especies vegetales de la lista de genes reportados como resistentes a <i>F. oxysporum</i> (Lista A) .....	22
<b>Figura 4.</b> Rutas metabólicas que participan en el mecanismo de defensa contra FOC R4T.....	30



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Proceso de construcción del comando de búsqueda de genes reportados como resistentes contra <i>Fusarium</i> sp. ....	42
<b>Anexo 2.</b> Lista de genes reportados como resistentes a <i>Fusarium</i> sp. en varias especies (Lista A) .....	43
<b>Anexo 3.</b> Lista de genes reportados como resistentes a <i>Fusarium</i> sp. en varias especies (Lista B).....	44
<b>Anexo 4.</b> Lista de genes asociados con la resistencia de Foc R4T en banano (Lista C).....	45
<b>Anexo 5.</b> Lista de cebadores utilizados durante el experimento.....	54

## RESUMEN

El banano es una de las frutas más importantes en el mundo y la más exportada a nivel mundial. El marchitamiento por *Fusarium* es una de las enfermedades más destructivas, siendo FOC R4T una amenaza para la industria bananera y la seguridad alimentaria del mundo. No existen variedades comerciales resistentes ni control químico eficaz contra este patógeno necrotrófico. Se presenta una metodología eficaz para encontrar genes de resistencia en cultivares de interés. El flujo de trabajo desarrollado está compuesto de dos vías: la base de datos "Nucleotide" y artículos sobre perfiles transcriptómicos (evaluación de FOC R4T frente a cultivares resistentes y susceptibles). Se obtuvieron nueve genes candidatos, de los cuales 5 participan en el proceso de interacción planta-patógeno, 2 en la biosíntesis de metabolitos secundarios y 2 en la transducción de señales de hormonas vegetales. Los resultados del análisis bioinformático fueron validados experimentalmente. Se utilizaron dos accesiones de cultivares diploides (AA), tres autotriploides (AAA), una alotriploides (AAB) y dos tetraploides (AAAB). Todos los genes de resistencia fueron encontrados en al menos una accesión, menos el gen RIN4. No se encontraron los genes PR1 y RPS2 en las accesiones alotriploides. La metodología desarrollada se presenta como una potencial herramienta para la búsqueda de material resistente contra FOC R4T y puede ser implementada en países en los que este hongo aún no esté presente. Es necesario seguir investigando los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia, para poder proponer estrategias de desarrollo de nuevos cultivares mediante nuevas tecnologías de mejoramiento genético.

**Palabras clave:** banano, *Fusarium oxysporum*, FOC R4T, resistencia

## ABSTRACT

Banana is one of the most important fruits in the world and the most exported worldwide. Fusarium wilt is one of the most destructive diseases, with FOC TR4 being a threat to the banana industry and world food security. There are no resistant commercial varieties or effective chemical control against this necrotrophic pathogen. An efficient methodology to find resistance genes in cultivars of interest is presented. The workflow developed is composed of two tracks: the "Nucleotide" database and articles on transcriptomic profiles (assessment of FOC TR4 against resistant and susceptible cultivars). Nine candidate genes were obtained, of which 5 participate in the plant-pathogen interaction process, 2 in the biosynthesis of secondary metabolites and 2 in the transduction of plant hormone signals. The results of the bioinformatic analysis were experimentally validated. Two accessions of diploid cultivars (AA), three autotriploids (AAA), one allotriploid (AAB) and two tetraploids (AAAB) were used. All resistance genes were found in at least one accession, except for the RIN4 gene. The PR1 and RPS2 genes were not found in the allotriploid accessions. The developed methodology is presented as a potential tool for the search for resistant material against FOC TR4 and can be implemented in countries where this fungus is not yet present. It is necessary to continue investigating the molecular mechanisms involved in resistance, to propose development strategies for new cultivars through new genetic improvement technologies.

**Keyword:** banana, *Fusarium oxysporum*, FOC TR4, resistance

## **Aplicación de la minería genómica en banano para la búsqueda de genes de resistencia a *Fusarium oxysporum***

El banano es una de las frutas más importantes en el mundo y la más exportada a nivel mundial. El marchitamiento por fusarium es una de las enfermedades más destructivas, siendo FOC R4T una amenaza para la industria bananera y la seguridad alimentaria del mundo. No existen variedades comerciales resistentes ni control químico eficaz contra este patógeno necrotrófico. Se presenta una metodología eficaz para encontrar genes de resistencia en cultivares de interés. El flujo de trabajo desarrollado está compuesto de dos vías: la base de datos “Nucleotide” y artículos sobre perfiles transcriptómicos (evaluación de FOC R4T frente a cultivares resistentes y susceptibles). Se obtuvieron nueve genes candidatos, de los cuales 5 participan en el proceso de interacción planta-patógeno, 2 en la biosíntesis de metabolitos secundarios y 2 en la transducción de señales de hormonas vegetales. Los resultados del análisis bioinformático fueron validados experimentalmente. Se utilizaron dos accesiones de cultivares diploides (AA), tres autotriploides (AAA), una alotriploides (AAB) y dos tetraploides (AAAB). Todos los genes de resistencia fueron encontrados en al menos una accesión, menos el gen RIN4. No se encontraron los genes PR1 y RPS2 en las accesiones alotriploides. La metodología desarrollada se presenta como una potencial herramienta para la búsqueda de material resistente contra FOC R4T y puede ser implementada en países en los que este hongo aún no esté presente. Es necesario seguir investigando los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia, para poder proponer estrategias de desarrollo de nuevos cultivares mediante nuevas tecnologías de mejoramiento genético.

Palabras claves: banano, *Fusarium oxysporum*, FOC R4T, resistencia

## INTRODUCCIÓN

Según la FAO, el banano es la fruta fresca más exportada a nivel mundial y el cuarto alimento más importante detrás del arroz, el trigo y el maíz [1]. El banano, al igual que otras especies vegetales, es susceptible a enfermedades causadas por patógenos (bacterias, hongos y virus) que ocasionan pérdidas significativas en su producción. Una de las enfermedades fúngicas más destructivas de los cultivos de banano es la fusariosis, causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) [2]. El primer reporte y descripción de esta enfermedad (FOC Raza 1) fue realizado en 1879 por el Dr. Joseph Bancroft [3]. Años más tarde (1890), esta raza desató en Panamá la primera epidemia a gran escala en las plantaciones de banano de exportación ‘Gros Michel’, lo que ocasionó grandes pérdidas económicas [4]. Durante la década de 1900, la enfermedad se extendió por todo el mundo: América Latina, el Caribe, África y Lejano Oriente. Se estima que las pérdidas económicas a causa de esta enfermedad, equivalen a 2.3 billones de USD en la actualidad [5].

La ineficiente contingencia de la enfermedad, junto al monocultivo y las rutas comerciales aglomeradas, hicieron necesaria la búsqueda de un cultivo resistente al patógeno [6]. Como resultado, se descubrió que la variedad “Cavendish”, proveniente del Jardín botánico de Reino Unido y la colección de “United Fruit Company” en Honduras, era resistente a este hongo necrotrófico [7]. Las plantaciones de “Cavendish” salvaron la industria bananera, por lo que ahora esta variedad es la más cultivada y consumida en todo el mundo. Sin embargo, se ha reportado una nueva raza que afecta a todas las musáceas, incluida “Cavendish”. Esta nueva enfermedad, denominada Raza 4 Tropical (FOC R4T), fue reportada por primera vez en 1970 en el sudeste asiático y Australia [8]. En el año 2000 se detectó en Papúa Nueva Guinea, China y Filipinas; en 2013 llegó a Mozambique y Jordania; en 2015 se registró un brote en Líbano, Omán, India y Pakistán [4]. En noviembre de 2019,

se confirmó molecularmente la presencia de FOC R4T al noroeste de Colombia [9], siendo el primer reporte en América Latina, y en abril del 2021, se detectó un nuevo caso en la región, en el departamento de Piura, Perú [10].

Actualmente, no existe ningún cultivar de banano comercial que sea resistente a FOC R4T, ni mucho menos algún tratamiento químico capaz de combatirlo [11]. El principal mecanismo para evitar su propagación es la prevención y la aplicación estricta de medidas fitosanitarias en los predios de producción [12]. FOC R4T no puede ser erradicado del suelo, puesto que persiste en forma de clamidosporas durante largos periodos de tiempo. En consecuencia, solo resta implementar estrategias de mitigación como un buen manejo del suelo y la introducción de material tolerante. La estrategia más plausible frente a esta problemática es la generación de cultivares resistentes a FOC R4T; a saber, requieren un manejo simple y flexible, creando además beneficios económicos y ecológicos. Sin embargo, el desarrollo de nuevos cultivares es complejo y costoso.

El Instituto de Investigación del Banano de Taiwán (TBRI) ha desarrollado diversas variedades somaclonales de “Giant Cavendish” (GCCTV, “Giant Cavendish” tissue-culture variant), siendo GCTCV-218 y GCTCV-219 tolerantes a FOC R4T [13,14]. Sumado a esto, presentan características agrícolas mejoradas como pseudotallo más firme, hojas más robustas, mejor formación de manos y racimos más grandes [14]. En 2017, se reportó la generación de una variedad transgénica resistente a FOC R4T mediante la introducción del gen antiapoptótico *ced-9* de *Caenorhabditis elegans* y el gen de resistencia análogo 2 (RGA2) de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* (pariente silvestre de los cultivares comerciales) [15]. Los plásmidos construidos fueron transformados en la variedad “Cavendish Grand Nain” y para comprobar su eficiencia se realizaron pruebas en campo durante 3 años. Las variantes RGA2-3 y Ced9-21 generaron resistencia a FOC R4T, debido

a que no se observaron síntomas internos (decoloración vascular) o externos de la enfermedad durante todo el experimento.

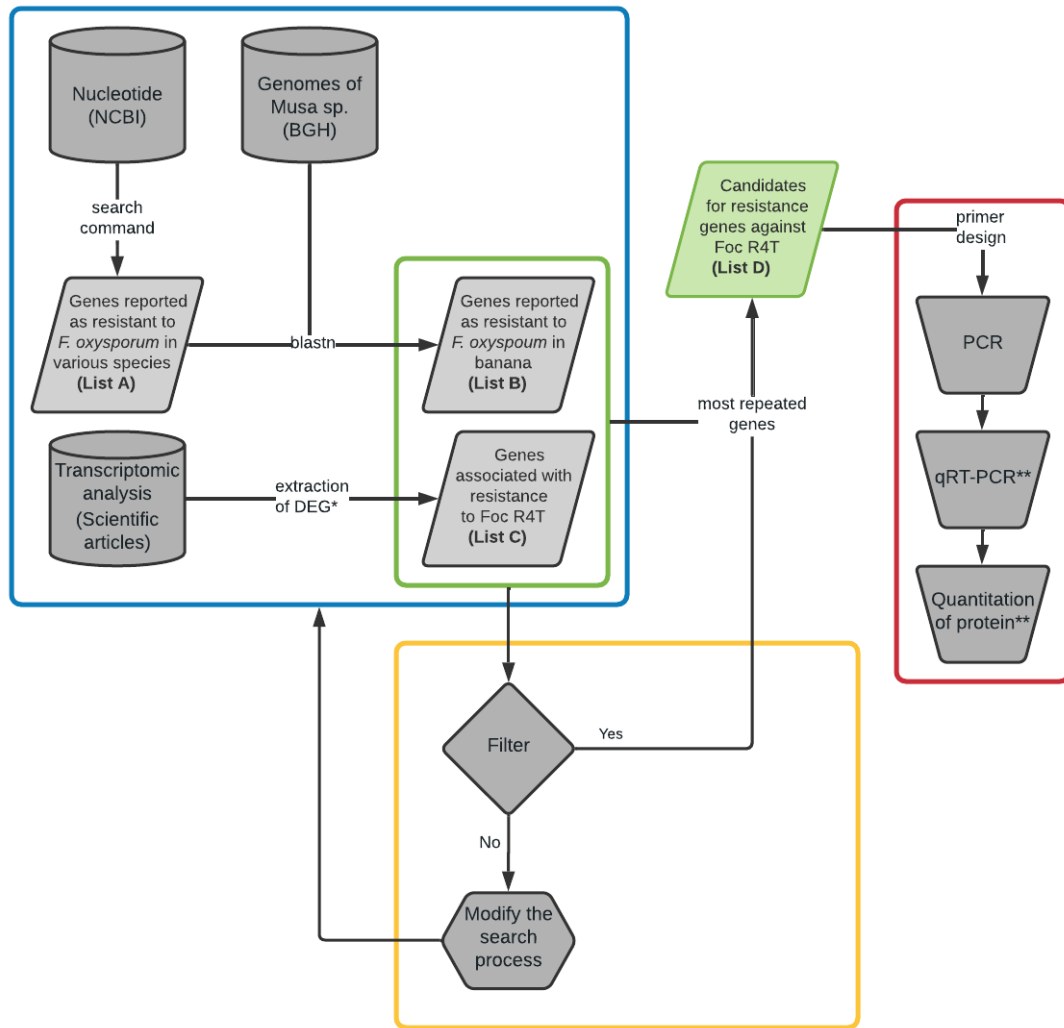
Se debe comprender los mecanismos de resistencia contra estos patógenos para el desarrollo de nuevos cultivares resistentes a enfermedades. El modelo zig-zag de Jones & Dangl describe de manera general el sistema inmunológico de las plantas y como se genera una amplitud final de resistencia o susceptibilidad a la enfermedad [16]. Los patógenos liberan moléculas PAMPs (patrones moléculas asociados a patógenos), los cuales son reconocidos por las células vegetales, específicamente por proteínas de membranas PRR (receptores de reconocimiento de patógenos) [17]. A este proceso se lo denomina “inmunidad desencadenada por patógenos” (PTI). En consecuencia, algunos patógenos superan esta barrera mediante la secreción de proteínas efectoras. Las plantas adaptadas sintetizan proteínas de resistencia (R), caracterizadas por tener un dominio NB-LRR. La interacción entre las moléculas efectoras y las proteínas R, provoca la “inmunidad desencadenada por efectores” (ETI) [17]. Finalmente, se induce una “respuesta hipersensible” (HR) que desemboca en una muerte celular programada, para así evitar la proliferación del patógeno. Esto provoca la liberación de proteínas tóxicas relacionadas con la patogénesis (PR) y forman parte de la “resistencia sistémica adquirida” (SAR) [18].

Aunque existe la necesidad apremiante de desarrollar nuevos cultivares resistentes a FOC R4T, uno de los principales problemas de este proceso es el cribado en campo para comprobar su resistencia. En países en donde aún no se ha reportado la enfermedad, esta tarea se vuelve irrealizable. Por ende, es necesario desarrollar métodos de cribado alternativos que permitan identificar individuos resistentes, derivados de los procesos de fitomejoramiento genético. En ese sentido, el objetivo de la presente investigación es diseñar una metodología bioinformática para identificar genes de resistencia contra FOC R4T.

## **MÉTODOS**

Se presenta una metodología de búsqueda de genes de resistencia contra FOC R4T presente en el genoma de banano (*Musa* sp.). El flujo de cajas consta de un análisis bioinformático junto a un método de validación experimental (Figura 1). En líneas generales, se inicia con la búsqueda en una base de datos biológicas y artículos científicos sobre análisis transcriptómicos, con el fin de encontrar secuencias genéticas dentro del genoma de banano que potencialmente estén participando en los mecanismos de defensa contra este patógeno. Al final, los resultados del análisis bioinformático son evaluados en el laboratorio, donde se desarrollan varios experimentos mediante herramientas de biología molecular.





**Figura 1.** Flujo de trabajo para la búsqueda de genes de resistencia contra FOC R4T presentes en el genoma de banano (*Musa* sp.)

Recuadro azul: proceso de búsqueda de genes; recuadro verde: set de datos resultado del proceso de búsqueda; recuadro amarillo: comprobación del proceso de búsqueda; cuadro rojo: validación experimental.

\*DEG: genes expresados diferencialmente

\*\*No se desarrollaron estos procedimientos en el presente trabajo de titulación

***Librería de genes asociados a resistencia contra Fusarium sp.***

La búsqueda de genes reportados como resistentes contra *Fusarium* sp. se realizó en la base de datos “Nucleotide” de NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide)). Se desarrolló un

comando de búsqueda mediante operadores booleanos y avanzados, utilizando dos palabras claves: “fusarium” y “resistance”. La línea de comando se acompañó de diversos filtros que limiten la búsqueda. Se descartaron las secuencias parciales, sintéticas, putativas, entre otras. Se trabajó solo con secuencias provenientes de plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (arroz), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Cucumis melo* (melón), entre otras. El proceso de construcción de esta secuencia de búsqueda se detalla en el Anexo 1; la lista de genes reportados como resistentes a *Fusarium* sp. en diversas especies (Lista A) se encuentra en el Anexo 2.

Para nutrir esta información, se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos de investigación en donde se reporta la evaluación del efecto de FOC R4T en banano mediante análisis transcripcionales. De todos los resultados, se seleccionaron 4 artículos [19–22], en los cuales se reportan análisis comparativos del transcriptoma entre cultivares de banano resistentes y susceptibles a FOC R4T. Se extrajo una lista de genes diferencialmente expresados (DEG) de cada artículo (Anexo 4), la que representa una nueva lista de genes asociados a resistencia de FOC R4T en banano (Lista C).

### ***Búsqueda genes reportados como resistentes a Fusarium sp. en los genomas de banano***

Se utilizó los genomas de referencia de banano de las especies silvestres *M. acuminata* (Genoma A) [23] y *M. balbisiana* (Genoma B) [24], los cuales se descargaron del Banana Genome Hub [25]. La búsqueda en los genomas se realizó mediante la herramienta BLAST en línea de comandos, conocido como BLAST+ [26]. Los genes de la “Lista A” fueron mapeados en los genomas mediante esta herramienta. Se utilizó el programa *blastn* con configuración por defecto, a excepción de los valores de recompensa/penalización y costos de brecha. Los criterios para la búsqueda de genes homólogos fueron de  $\geq 60\%$  para el

porcentaje de identidad y  $\geq 80\%$  para el porcentaje de cobertura. En ese sentido, la búsqueda no fue estricta, por lo que se utilizó una proporción de 1.25 para la recompensa/penalización (5/-4) y los costos de brecha fueron de 8/6 (abrir/extender). Los genes encontrados fueron agrupados en la “Lista B” (Anexo 3).

### ***Genes de resistencia contra FOC R4T presente en el genoma de banano (Musa sp.)***

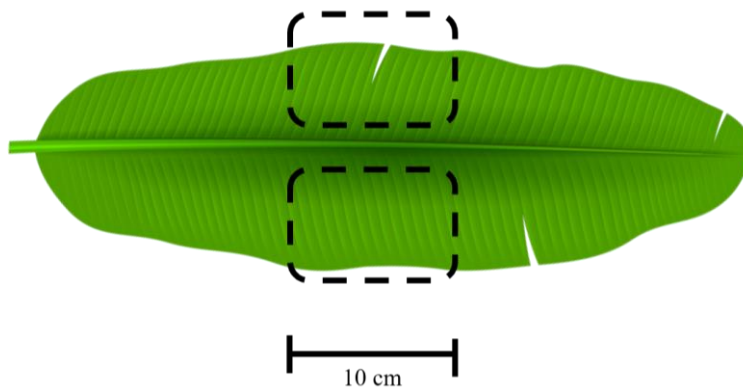
Finalmente, se obtuvo un compendio de datos compuesto por los genes de la “Lista B” y “Lista C”. Este conjunto de datos fue sometido a un filtro, el cual consistió en la presencia de al menos uno de los genes de resistencia con validación experimental (RGC2 y RGC5) [15,27,28]. Si no aprueba el filtro, se debe modificar la línea de comando para la búsqueda en NCBI, mencionado anteriormente. Seguidamente, se unieron las dos listas y se seleccionaron los genes que se repiten en al menos dos referencias, para así obtener los genes candidatos asociados a la resistencia contra FOC R4T, denominada como Lista C.

### ***Diseño y síntesis de cebadores***

Los cebadores para cada uno de los genes fueron diseñados en la plataforma de Primer-BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)), tomando en cuenta los criterios de longitud ( $\leq 20$  pb), temperatura de hibridación (entre 57 a 62 °C) y porcentaje de GC (entre 45 a 60%). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa GENEWIZ, Inc. Los genes utilizados como control positivo del experimento fueron RGC2 y RGC5, los cuales se han descrito y asociado a la resistencia contra FOC R4T en base a una fuerte evidencia científica [15,27,28]. Los genes TUBB y ACT3 fueron utilizados como control interno de la amplificación de ADN de banano. La lista completa de cebadores utilizados se encuentra en el Anexo 5.

### ***Extracción de ADN***

Se utilizaron ocho accesiones de banano: dos diploides (AA), tres autotriploides (AAA), una alotriploide (AAB) y dos tetraploides (AAAB), de una colección de 74 accesiones de musáceas, perteneciente a la “Estación Experimental Tropical Pichilingue” de INIAP. De cada una de las accesiones se colectó la hoja No. 3, enumerada desde arriba a abajo. Se extrajo una franja de 10 cm de la parte central de la hoja, tomando ambos lados de la nervadura central (Figura 2) [29].



**Figura 2.** Sección de la hoja utilizada para la extracción de ADN

Líneas entrecortadas: delimitación de muestra biológica

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de extracción de ADN de *Theobroma cacao* desarrollado por Doyle & Doyle [30] y modificado por Lozada [31]. La calidad y la cantidad del ADN se cuantificó por espectrofotometría UV-Vis (Hitachi U-2900/U-2910 UV-Vis Double Beam Spectrophotometer). La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa. Se utilizó un gel de agarosa al 1% teñido con SYBR<sup>TM</sup> Safe DNA Gel Stain (Invitrogen<sup>TM</sup>), empleando una cámara electroforética (ENDURO<sup>TM</sup> Gel XL Electrophoresis System - Labnet International, Inc.). Por último, la visualización del gel se realizó en el fotodocumentador Benchtop<sup>TM</sup> 2UV Transilluminator (BioDoc-It® Imaging System).

### ***Amplificación por PCR y visualización de resultados***

Se realizó dos amplificaciones por PCR para cada juego de cebadores (duplicado) en cada una de las accesiones de banano. La PCR se realizó empleando el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation) en base a las especificaciones del fabricante. Las condiciones del termociclador fueron de 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 3 minutos, finalizando con una extensión final a 72°C durante 10 minutos [32]. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando el mismo procedimiento descrito en la sección anterior.

### ***Análisis de las rutas metabólicas de los genes de resistencia***

Se identificó las rutas metabólicas en las que participan los genes obtenidos del cribado bioinformático. Para ello, se utilizó la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) [33]. La integración de las rutas enzimáticas y posibles conexiones entre estas proteínas, se plasmaron en una representación gráfica (Figura 4).

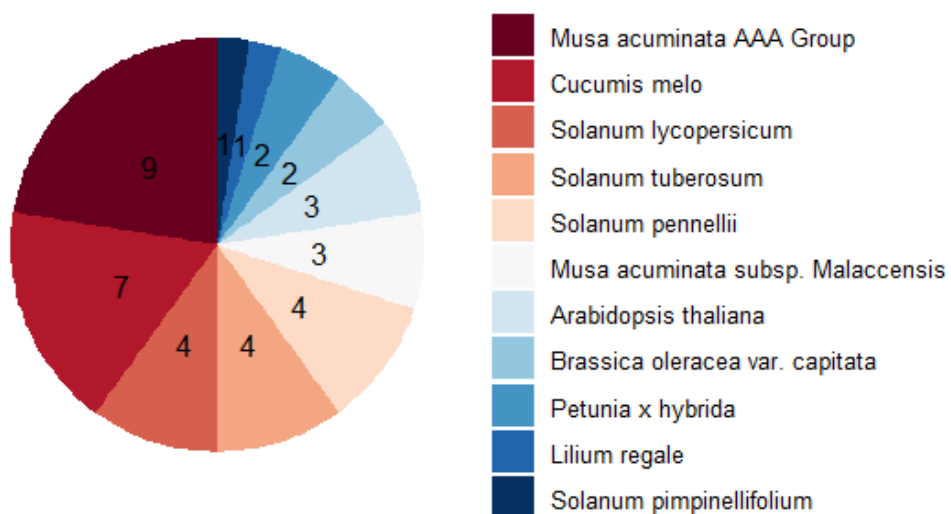
## **RESULTADOS**

Aunque el término de “genes de resistencia” hace referencia a genes que codifican proteínas de resistencia (R), caracterizadas por tener dominios de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NB-LRR), el análisis bioinformático diseñado permite encontrar secuencias de cualquier familia de genes. En el presente artículo se utilizará el término de “genes de resistencia” para referirse a cualquier secuencia genética que este involucrada en los mecanismos subyacentes del sistema inmunológico de las plantas.

### ***Búsqueda de genes de resistencia contra *F. oxysporum****

En primer lugar, se inició con una búsqueda meticulosa en la base de datos “Nucleotide” de

NCBI. Se desarrolló una línea de comando para encontrar genes reportados como resistentes a *F. oxysporum* en cualquier especie vegetal (Anexo 1). La búsqueda fue delimitada para encontrar únicamente secuencias que presenten evidencia experimental. Se obtuvieron 40 secuencias genéticas, las cuales se agruparon bajo el nombre de “Lista A” (Anexo 2). La distribución de las especies vegetales que corresponden a los genes de la “Lista A” se ilustra en la figura 3. Las especies más abundantes fueron banano (*M. acuminata* AAA y *M. acuminata* subsp. *malaccensis*) y melón (*Cucumis melo*), con 12 y 7 genes, respectivamente. Luego, estos genes (Lista A) fueron mapeados en el genoma de *M. acuminata* y *M. balbisiana*, descargados del Banana Genome Hub (BGH). Se encontraron 13 genes homólogos, correspondientes a los 12 genes de banano y un gen de *Lilium regale*, estos fueron agrupados en la lista denominada “Lista B” (Anexo3).



**Figura 3.** Distribución de las especies vegetales de la lista de genes reportados como resistentes a *F. oxysporum* (Lista A).

En segundo lugar, se examinaron las investigaciones que analizan los perfiles transcriptómicos de los cultivares de banano resistentes y susceptibles a FOC R4T. Se

extrajo los genes expresados diferencialmente (DEG) para crear un segundo conjunto de genes asociados con la resistencia a FOC R4T, denominada como “Lista C” (Anexo 4). En consecuencia, se obtuvo un compendio de datos compuesto por los genes de la “Lista B” y “Lista C”. Para comprobar el funcionamiento adecuado del proceso, se sometió al set de datos a un filtro que consistente en la presencia de al menos un gen de resistencia que haya sido validado experimentalmente contra FOC R4T (RGC2 o RGC5) [15,27,28].

Una vez aprobado el filtro, se consolidaron las dos listas y se seleccionaron los genes que se repiten en al menos dos referencias. Como resultado, se obtuvieron 9 genes candidatos asociados a la resistencia contra FOC R4T (Tabla 1). Las proteínas codificadas por estos genes están involucradas en diversas rutas metabólicas que podrían participar en el complejo sistema inmunitario; se encontró que 5 genes participan en el proceso de interacción planta-patógeno, 2 en la biosíntesis de metabolitos secundarios y 2 en la transducción de señales de hormonas vegetales.

**Tabla 1.** Lista de genes de resistencia contra FOC R4T presentes en el genoma de banano (*Musa* sp.) (Lista D)

Gen	Lista A	Lista B				Rutas metabólicas
	Base de Datos <sup>1</sup>	de Niu <i>et al.</i> 2018 [22] <sup>2</sup>	Sun <i>et al.</i> 2019 [19] <sup>3</sup>	Zhang <i>et al.</i> 2019 [20] <sup>4</sup>	Li <i>et al.</i> 2020 [21] <sup>5</sup>	
<b>Pathogenesis-related protein 1</b>	Ma03_g08150	Ma02_g15060	Ma02_t15050 Ma02_g15080 Ma04_g29630	Ma03_g08140 Ma03_g08150 Ma09_g15840 Ma03_g08160 Ma08_g34150 Ma01_g19550	S/R	- Vía de señalización MAPK - Transducción de señales de hormonas vegetales - Interacción planta-patógeno
<b>Chalcone synthase</b>	Ma06_g12370 Ma10_g20600	Ma10_g20590 Ma10_g20600	Ma06_t12370 Ma10_g12450	Ma03_g01020 Ma10_g20560	S/R	- Biosíntesis de flavonoides - Ritmo circadiano
<b>RPM1-interacting protein 4</b>	S/R	S/R	Ma03_g12680	S/R	Ma03_g12680	- Interacción planta-patógeno
<b>Disease resistance protein RPM1</b>	S/R	S/R	Ma09_g28690 Ma06_g31500	Ma08_g31160	S/R	- Interacción planta-patógeno
<b>Disease resistance protein RPS2</b>	S/R	S/R	Ma07_g08510	Ma04_g35240	S/R	- Interacción planta-patógeno

<b>WRKY transcription factor 22</b>	S/R	S/R	Ma10_g06870 Ma10_g14830	Ma10_g06870	S/R	- Vía de señalización MAPK - Interacción planta-patógeno
<b>Regulatory protein NPR1</b>	Ma06_g02690	S/R	Ma06_g02690	S/R	S/R	- Transducción de señales de hormonas vegetales
<b>Transcription factor TGA4</b>	Ma05_g19490	S/R	Ma08_g05650	S/R	S/R	- Transducción de señales de hormonas vegetales
<b>Phenylalanine ammonia-lyase</b>	Ma01_g04420	Ma11_g14940	S/R	S/R	S/R	- Metabolismo y biosíntesis de la fenilalanina
<sup>1</sup> Resultados de búsqueda en “Nucleotide” (NCBI)						
<sup>2</sup> Susceptible: Musa spp. AAA cv. “Baxijiao”, Resistente: Musa spp. AAA cv. “Yueyoukang 1”						
<sup>3</sup> Susceptible: M. acuminata L. AAA Cavendish cv. Williams, Resistente: M. acuminata L. AAA Cavendish cv. “Guijiao 9”						
<sup>4</sup> Susceptible: Musa AAA Cavendish “Brazilian”, Resistente: Musa acuminata (subsp. malaccensis) “Pahang” (AA)						
<sup>5</sup> Susceptible: Brazilian (AAA), Resistente: M. acuminata ssp. burmannicoides (AA)						
S/R: sin respuesta						

### ***Amplificación por PCR de genes de resistencia***

Se diseñaron cebadores específicos para estos 9 genes, en conjunto con dos genes de resistencia (RGA5 y RGA2) y dos marcadores moleculares de banano (beta tubulina y actina). Estos genes fueron mapeados en 8 accesiones de banano provenientes del banco de germoplasma de musáceas de INIAP. En la Tabla 2 se muestran los resultados de la amplificación por PCR de los genes candidatos. Se logró amplificar 7 genes, a excepción de RIN4 (RPM1-interacting protein 4). PR1 (Pathogenesis-related protein 1) y RPS2 (Disease resistance protein RPS2) no se encuentran en el genoma de las accesiones alotriploides (AAB). En las accesiones tetraploides (AAAB) se confirmó la presencia de varios genes, principalmente CHS (Chalcone synthase), NPR1 (Regulatory protein NPR1) y PAL (Phenylalanine ammonia-lyase). Por otro lado, el gen RGC2 (Resistance gene candidate 2) presenta un amplicón de ~707 pb en todas las accesiones. En las accesiones alotriploides (AAB) se logra apreciar un amplicón adicional de mayor tamaño (~ 900 pb); mientras que



en aquellas con genomas tetraploides (AAAB), se obtuvo un amplicón de ~ 1 100 pb. En la accesión “Unknown” (AAAB) se aprecian tres amplicones en total (707, 900 y 1 100 pb, respectivamente).

**Tabla 2.** Genes de resistencia contra FOC presente en el genoma de diversas variedades de banano (*Musa* sp.)

Tipo	Nombre del gen	Variedades								Tamaño del amplicón (bp)
		Musa acuminata (AA)	Musa acuminata (AA)	Unknown (AAAB)	Dominico (AAB)	FHIA-01 (AAAB)	Dominico (AAB)	Williams (AAA)	Curaré (AAB)	
Genes de resistencia candidatos	Pathogenesis-related protein 1									181
	Chalcone synthase									189
	Disease resistance protein RPM1									163
	Disease resistance protein RPS2									174
	WRKY transcription factor 22									176
	Regulatory protein NPR1									178
	Phenylalanine ammonia-lyase									260
Genes de validación	Resistance gene candidate 5									199
	Resistance gene candidate 2									1100 900 707
Marcadores moleculares	Tubulin beta chain									1110
	Actin-3									173

## **DISCUSIÓN**

La metodología implementada está compuesta de un análisis bioinformático, con el cual se generó una lista de genes candidatos de resistencia, y un componente experimental, capaz de identificar su presencia en cualquier accesión de banano. De esta forma, se presenta una herramienta de cribado alternativa para identificar posibles cultivares de banano resistentes contra FOC R4T, opción que se puede utilizar en lugares donde aún la enfermedad no se ha hecho presente.

### ***Búsqueda de genes de resistencia contra *F. oxysporum****

Existen diversos estudios que han desarrollado análisis bioinformáticos para buscar genes que participen en los mecanismos de resistencia contra fitopatógenos [34–38]; sin embargo, la gran mayoría de las investigaciones se centran exclusivamente en genes que codifican proteínas R (dominio NB-LRR). Si bien esta familia de proteínas participa de forma activa en la interacción planta-patógeno [39], no se puede descartar que otras rutas metabólicas intervengan en los mecanismos de resistencia.

En estudios previos se han identificado rutas metabólicas que participan en la resistencia contra FOC en banano [40], sin embargo aún no se tiene un conocimiento holístico de todo el proceso ni se han definido genes claves. Este estudio presenta una metodología de búsqueda que se nutre por dos corrientes de datos: la base de datos ‘Nucleotide’ y los artículos sobre perfiles transcriptómicos. Las bases de datos biológicas representan un recurso valioso en la búsqueda avanzada de secuencias biológicas, ya que permiten recuperar información con un alto grado de especificidad [41]. Una de las desventajas observadas es la deficiencia en las anotaciones, debido a que no se registra la función que cumple la secuencia genética. En ocasiones, esto ocurre por un desconocimiento

del rol que desempeña el gen o una incorrecta anotación [42]. La búsqueda avanzada permitió identificar secuencias que tengan en su registro las palabras de búsqueda, en lugar de buscar la función que cumplen dentro del organismo.

Para suplir estas carencias se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva. Se analizaron cuatro artículos científicos que evalúan la expresión génica de diversas musáceas resistentes y susceptibles a FOC R4T [19–22]. En dichas investigaciones se empleó como genoma de referencia la segunda versión del genoma de *M. acuminata* [23]. Cabe mencionar que existen más investigaciones de este tipo, pero no fueron tomadas en cuenta ya que algunas emplean a FOC Raza 1 [43], evalúan únicamente cultivares susceptibles [21,44–46], utilizan el primer borrador del genoma de banano [47,48], realizan un ensamblaje sin genoma de referencia [49] o no proporcionan suficiente información [50]. Los DEGs extraídos de los artículos seleccionados brindaron una mayor robustez a la metodología y a la validez de las secuencias obtenidas en primera instancia. Los genes de resistencia encontrados codifican proteínas claves que probablemente estén desempeñando un papel en la resistencia contra FOC R4T.

### ***Análisis de las rutas metabólicas de los genes de resistencia***

En nuestro estudio, se identificaron nueve genes asociados a la resistencia contra FOC R4T presentes en el genoma de banano: PR1, CHS, RIN4, RPM1, RPS2, WRKY22, NPR1, TGA4 y PAL.

El gen PR1 pertenece a la superfamilia de proteínas PR que se inducen por el ataque de patógenos o por la señalización del ácido salicílico (SA). [51]. Las proteínas PR se clasifican en 17 familias en base a los dominios conservados y las actividades biológicas que desempeñan [52]. PR1 es la principal familia que participa en la resistencia, proceso que finaliza con la muerte celular mediante la respuesta HR. Se ha encontrado que existe una

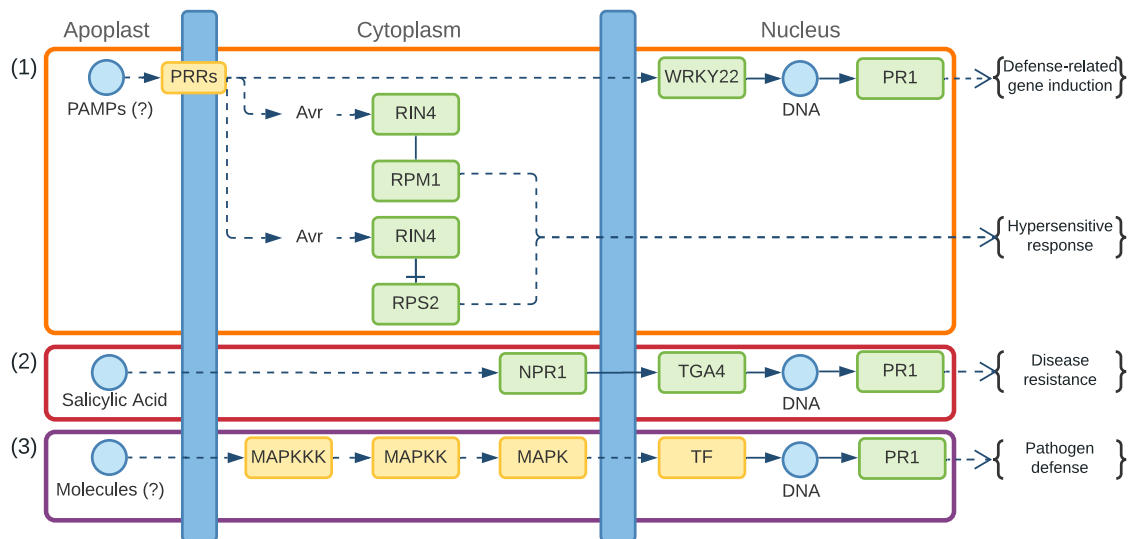
mayor expresión y acumulación de los genes PR1 en los cultivares resistentes. Se presume que PR1 actúa en la respuesta temprana contra FOC, tanto en la raza 1 [43], como en la raza 4 tropical [19,20,47,49,53]. Sin embargo, aún se desconoce si el enriquecimiento proviene por las vías de interacciones planta-patógeno (Figura 4.1) o señalización del SA (Figura 4.2).

Los genes RPM1 (Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1) y RIN4 (RPM1-interacting protein 4) codifican proteínas que también participan en la interacción planta-patógeno. RPM1 es una proteína de resistencia NB-LRR que actúa contra *Pseudomonas syringae* [54]. RIN4 modula la resistencia por RPS2 y la acumulación de RPM1 en la membrana, mediante la interacción con moléculas efectoras (AvrB y AvrRpm1) [55,56]. En algunos casos, se ha observado que existe una sobreexpresión del complejo RIN4/RPM1 en los cultivares de banano resistentes a FOC R4T [19,48]; mientras que en otros casos RIN4 ha presentado una regulación a la baja [47], que desemboca en la resistencia mediada por RPS2 (Figura 4.1). Dado que aún no se esclarece la participación de RIN4, se requieren nuevas investigaciones para identificar los efectores específicos empleados por este patógeno.

SA desempeña diversas funciones importantes durante el desarrollo de las plantas, así como aumenta la respuesta inmunológica en condiciones de estrés por factores bióticos o abióticos [57]. La biosíntesis de SA se produce por la vía ICS (Isochorismate synthase) o PAL; ambas participan en los mecanismos inmunológicos de las plantas, específicamente en la respuesta HR y SAR [58]. PAL es una enzima clave en el metabolismo de los fenilpropanoides, que a su vez se relaciona con otras rutas metabólicas como la biosíntesis de lignina. La acumulación de PAL se la ha vinculado con la resistencia a hongos, como es el caso del algodón (*Gossypium barbadense*) contra el patógeno *Verticillium dahliae* [59]; este mismo comportamiento se ha observado durante el estrés a altas temperaturas [60]. Otra

de las rutas relacionadas a este compuesto son las vías de señalización SA; que actúa directamente sobre la proteína citoplasmáticas NPR1 mediante un mecanismo que no se entiende completamente [61,62]. NPR1 se transloca hacia núcleo, en donde induce la expresión del gen PR1 mediante el reclutamiento de factores de transcripción TGA (Figura 4.2) [63]. Otro de los factores de transcripción que participan en esta vía de señalización son los WRKYs, de los cuales se sabe que actúan en la resistencia al estrés biótico [64]. Esta familia de genes se encuentra asociada a la resistencia contra FOC R4T [20,22,43,47], en donde se ha observado niveles de expresión hasta dos veces más altos y enriquecimientos en las vías de señalización (Figura 4.3). Se ha encontrado en diversas investigaciones que la biosíntesis de SA y las vías de señalización hormonal desempeña un rol importante en la resistencia contra FOC R4T [19,20,47,65]. Sin embargo, en otras investigaciones estas rutas metabólicas no muestran diferencias significativas durante el proceso de infección en cultivos susceptibles [45,48,65]. Por ello, se debe seguir investigando la vía de señalización del SA y otros reguladores en banano, para esclarecer el rol que desempeñan en la resistencia contra este patógeno.

Otras de las rutas metabólicas que participan en la resistencia a enfermedades en las plantas son la biosíntesis de metabolitos secundarios [66], entre ellas la biosíntesis de flavonoides [67]. En el análisis bioinformático se obtuvieron dos genes (chalcone synthase CHS y phenylalaline ammonia-lyase PAL) que forman parte de la biosíntesis de flavonoides. Se ha reportado la acumulación de diversas enzimas clave de esta ruta en los cultivos resistentes a FOC R4T, en comparación con los cultivares susceptibles [19,20,22]. Por lo tanto, la biosíntesis de metabolitos secundarios puede desempeñar un rol importante en la resistencia contra este hongo.



**Figura 4.** Rutas metabólicas que participan en el mecanismo de defensa contra FOC R4T. Recuadro rojo: vía de transducción de señales de hormonas vegetales; recuadro morado: vía de señalización MAPK; recuadro naranja: interacción planta-patógeno; cuadros amarillos: proteínas putativas; cuadros verdes: proteínas de resistencia candidatas; línea continua: interacción directa comprobada; línea entrecortada: vías desconocidas o sin validación experimental. Basado en las rutas metabólicas de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) [33].

#### ***Indagación de los genes de resistencia en accesiones de banano***

La amplificación por PCR permitió confirmar si las accesiones estudiadas presentan los genes de resistencia candidatos. Todos los genes de resistencia fueron encontrados en al menos un cultivar, a excepción del gen RIN4. Este resultado se puede explicar debido a una pérdida de genes durante la especiación de los cultivares de banano [68]. PR1 y RPS2 representan un caso particular, ya que no se encuentran en los cultivares alotriploides (AAB). La pérdida de genes está marcada por la prescindibilidad de mismo dentro del organismo, definido por la existencia de genes redundantes o vías alternativas [69]. Es posible que estos genes presenten varias copias dentro del genoma, de modo que el parálogo en cuestión fue eliminado mediante los procesos evolutivos. Otra posible explicación provendría de los eventos de duplicaciones del genoma completo (poliploidización) en banano; se sabe que el

pariente silvestre *M. acuminata* sufrió tres eventos de poliploidización [70]. Los análisis transcriptómicos de los cultivares de banano explican que existe una alta variabilidad entre los cultivos alotriploides, debido a intercambios homólogos y diferencias en la contribución de los genomas A (*M. acuminata*) y B (*M. balbisiana*) [71]. A su vez, se puede manejar la hipótesis de un incorrecto diseño de cebadores, lo que se podría corroborar mediante la amplificación de otras regiones de los genes en cuestión. En ese sentido, no es posible emitir una justificación concisa para estos fenómenos, por lo que se requieren más estudios para abordar la ausencia de estos genes en las accesiones evaluadas.

Los genes de validación RGA2 y RGA5 se utilizaron como método de comprobación del proceso de búsqueda. Existe un consenso científico sobre la importancia de estos genes contra FOC R4T, ya que se han identificado en reiteradas ocasiones su participación en la resistencia [15,27,28]. Un hecho curioso es el patrón electroforético de RGA2, en donde se aprecian tres bandas. Esto se debe a que la región amplificada del gen RGA2 abarca una región no codificante, y este exón varía de tamaño según el genotipo. Según el análisis de BLAST, el genotipo ancestral de *M. acuminata* ([HG996468](#)) genera un amplicón de 707 pb, mientras que en *M. balbisiana* ([CM017195](#)) se obtiene un amplicón de 1 110 pb.

En la siguiente etapa del proyecto de investigación se realizará una cuantificación de los niveles de expresión de esta lista de genes (Tabla 1). Se pretende extraer el ARNm de los cultivares en estado de campo y realizar una qRT-PCR para determinar si los individuos presentan una respuesta constitutiva. La siguiente etapa consiste en inocular a los individuos con el hongo y evaluar su respuesta a nivel transcriptómico, para estudiar la expresión de estos genes cuando se enfrenta al patógeno. Finalmente, se realizará una cuantificación de las proteínas que se están expresando, para analizar sus niveles de expresión entre los diversos cultivares.

## **CONCLUSIONES**

Los análisis bioinformáticos permiten identificar genes candidatos de resistencia para enfermedades específicas, sirviendo como punto de partida para los estudios en laboratorio y campo. Además, representan un recurso importante para los países en desarrollo como Ecuador, ya que se reducen los tiempos y costos de investigación. La metodología desarrollada permitió identificar 9 genes de resistencia candidatos, los cuales podrían desempeñen un papel importante en la resistencia contra FOC R4T. El cribado de datos es una poderosa herramienta para la búsqueda de material resistente contra FOC R4T y puede ser implementado en países donde todavía no haya ingresado la enfermedad. Se deben realizar investigaciones integrales para desentrañar las vías metabólicas detrás de la resistencia innata de las variedades silvestres. La metodología desarrollada servirá como punto de partida en la búsqueda de nuevos genes diana, necesarios para las aplicaciones nuevas técnicas de mejoramiento en banano. Estos resultados sentarán las bases de un programa de mejoramiento genético dirigido para el desarrollo de nuevos cultivares resistentes a FOC R4T.



## REFERENCIAS

- [1] FAO. La Economía Mundial del Banano 1985-2002 [Internet]. Roma; 2004. Available from: <http://www.fao.org/3/y5102s/y5102s00.htm>.
- [2] Stover RH, others. Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other Musa species. Fusarial wilt (Panama Dis Banan other Musa species. 1962;
- [3] Bancroft J. Report of the board appointed to enquire into the cause of disease affecting livestock and plants. Votes Proc. 1876;1877:1011–1038.
- [4] Altendorf S. Banana Fusarium Wilt Tropical Race 4: A mounting threat to global banana markets? FAO. 2019;13–20.
- [5] Ploetz RC. Panama disease: an old nemesis rears its ugly head: part 1. the beginnings of the banana export trades. Plant Heal Prog. 2005;6:18.
- [6] Ploetz RC. Fusarium wilt of banana [Internet]. Phytopathology. American Phytopathological Society; 2015 [cited 2021 Feb 18]. p. 1512–1521. Available from: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>.
- [7] Ordonez N, Seidl MF, Waalwijk C, et al. Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease—When Plant and Pathogen Clones Meet. Sheppard DC, editor. PLOS Pathog [Internet]. 2015 [cited 2021 Oct 11];11:e1005197. Available from: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005197>.
- [8] Dita M, Barquero M, Heck D, et al. Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. Front Plant Sci [Internet]. 2018;9:1468. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.01468>.
- [9] García-Bastidas FA, Quintero-Vargas JC, Ayala-Vasquez M, et al. First Report of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Cavendish Bananas Caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. Plant Dis [Internet]. 2020;104:994. Available from: <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>.
- [10] SENASA. PERU: Primer Reporte sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Raza 4 Tropical, W.C. Snyder & H.N. Hansen 1940. Lima; 2021.
- [11] Pegg KG, Coates LM, O'Neill WT, et al. The Epidemiology of Fusarium Wilt of

- Banana. *Front Plant Sci* [Internet]. 2019;10:1–19. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01395/full>.
- [12] FAO. Luchar contra la marchitez por fusarium del banano. 2016.
- [13] Lee SY, Su YU, Chou CS, et al. Selection of a new somaclone cultivar “Tai-Chiao No. 5” (AAA, Cavendish) with resistance to Fusarium Wilt of banana in Chinese Taipei. *Acta Hort* [Internet]. 2011;391–397. Available from: [https://www.actahort.org/books/897/897\\_54.htm](https://www.actahort.org/books/897/897_54.htm).
- [14] Hwang S-CC, Ko W-HH. Cavendish banana cultivars resistant to fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Dis* [Internet]. 2004;88:580–588. Available from: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS.2004.88.6.580>.
- [15] Dale J, James A, Paul J-YY, et al. Transgenic Cavendish bananas with resistance to Fusarium wilt tropical race 4. *Nat Commun* [Internet]. 2017;8:1496. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-01670-6>.
- [16] Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature* [Internet]. 2006;444:323–329. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature05286>.
- [17] Andersen E, Ali S, Byamukama E, et al. Disease Resistance Mechanisms in Plants. *Genes (Basel)* [Internet]. 2018;9:339. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4425/9/7/339>.
- [18] Fu ZQ, Dong X. Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annu Rev Plant Biol* [Internet]. 2013;64:839–863. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>.
- [19] Sun J, Zhang J, Fang H, et al. Comparative transcriptome analysis reveals resistance-related genes and pathways in *Musa acuminata* banana “Guijiao 9” in response to Fusarium wilt. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2019;141:83–94. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.05.022>.
- [20] Zhang L, Cenci A, Rouard M, et al. Transcriptomic analysis of resistant and susceptible banana corms in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9:8199. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-44637-x>.

- [21] Li W-M, Dita M, Rouard M, et al. Deep RNA-seq analysis reveals key responding aspects of wild banana relative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Funct Integr Genomics* [Internet]. 2020;20:551–562. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10142-020-00734-z>.
- [22] Niu Y, Hu B, Li X, et al. Comparative digital gene expression analysis of tissue-cultured plantlets of highly resistant and susceptible banana cultivars in response to *Fusarium oxysporum*. *Int J Mol Sci*. 2018;19.
- [23] Martin G, Baurens F-C, Droc G, et al. Improvement of the banana “*Musa acuminata*” reference sequence using NGS data and semi-automated bioinformatics methods. *BMC Genomics* [Internet]. 2016 [cited 2021 Jun 9];17:243. Available from: <http://banana-genome.cirad.fr/download>.
- [24] Davey MW, Gudimella R, Harikrishna JA, et al. “A draft *Musa balbisiana* genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific *Musa* hybrids.” *BMC Genomics* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 8];14:683. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2164-14-683>.
- [25] Droc G, Larivière D, Guignon V, et al. The Banana Genome Hub. Database [Internet]. 2013;2013. Available from: <https://academic.oup.com/database/article/doi/10.1093/database/bat035/334636>.
- [26] NCBI. BLAST® Command Line Applications User Manual [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2008. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279690/>.
- [27] Peraza-Echeverria S. Molecular cloning and characterisation of potential fusarium resistance genes in banana ( *Musa acuminata* ssp . *malaccensis* ). 2007;
- [28] Peraza-Echeverria S, Dale J, Harding RM, et al. Molecular cloning and in silico analysis of potential *Fusarium* resistance genes in banana. *Mol Breed* [Internet]. 2009 [cited 2021 Feb 18];23:431–443. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11032-008-9247-6>.
- [29] Lahav E, Turner D. Fertilización del banano para rendimientos altos. INPOFOS. Quito; 1992.
- [30] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh

- leaf tissue. *Phytochem Bull* [Internet]. 1987;19:11–15. Available from:  
<http://worldveg.tind.io/record/33886>.
- [31] Lozada Vargas PF. Caracterización molecular de 42 accesiones de la colección de genotipos de cacao nacional (*Theobroma cacao* L.) de la EET Pichilingue, INIAP, mediante el uso de marcadores microsatélites (SSRS). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE; 2014.
- [32] Dita MA, Waalwijk C, Buddenhagen IW, et al. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathol* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jul 16];59:348–357. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x>.
- [33] Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, et al. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021;49:D545–D551. Available from:  
<https://academic.oup.com/nar/article/49/D1/D545/5943834>.
- [34] Zheng F, Wu H, Zhang R, et al. Molecular phylogeny and dynamic evolution of disease resistance genes in the legume family. *BMC Genomics* [Internet]. 2016 [cited 2021 Feb 18];17:402. Available from:  
<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2736-9>.
- [35] Wan H, Yuan W, Bo K, et al. Genome-wide analysis of NBS-encoding disease resistance genes in *Cucumis sativus* and phylogenetic study of NBS-encoding genes in Cucurbitaceae crops. *BMC Genomics* [Internet]. 2013;14:109. Available from:  
<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-109>.
- [36] Wan H, Yuan W, Ye Q, et al. Analysis of TIR- and non-TIR-NBS-LRR disease resistance gene analogous in pepper: characterization, genetic variation, functional divergence and expression patterns. *BMC Genomics* [Internet]. 2012;13:502. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-502>.
- [37] Christopoulou M, Wo SR-C, Kozik A, et al. Genome-Wide Architecture of Disease Resistance Genes in Lettuce. *G3 Genes|Genomes|Genetics* [Internet]. 2015;5:2655–2669. Available from:  
<https://academic.oup.com/g3journal/article/5/12/2655/6028969>.

- [38] Xue J-Y, Zhao T, Liu Y, et al. Genome- Wide Analysis of the Nucleotide Binding Site Leucine-Rich Repeat Genes of Four Orchids Revealed Extremely Low Numbers of Disease Resistance Genes. *Front Genet* [Internet]. 2020;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.01286/full>.
- [39] Hammond-Kosack KE, Jones JDG. Plant Disease Resistance Genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [Internet]. 1997;48:575–607. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.48.1.575>.
- [40] Swarupa V, Ravishankar K V., Rekha A. Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta* [Internet]. 2014;239:735–751. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-013-2024-8>.
- [41] Baxevanis AD. The Importance of Biological Databases in Biological Discovery. *Curr Protoc Bioinforma* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471250953.bi0101s34>.
- [42] Dall’Olio GM, Bertranpetit J, Laayouni H. The annotation and the usage of scientific databases could be improved with public issue tracker software. *Database (Oxford)* [Internet]. 2010;2010:baq035. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21186182>.
- [43] Kaushal M, Mahuku G, Swennen R. Comparative Transcriptome and Expression Profiling of Resistant and Susceptible Banana Cultivars during Infection by *Fusarium oxysporum*. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22:3002. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/6/3002>.
- [44] Dong H, Ye Y, Guo Y, et al. Comparative transcriptome analysis revealed resistance differences of Cavendish bananas to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race1 and race4. *BMC Genet* [Internet]. 2020;21:122. Available from: <https://bmcgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-020-00926-3>.
- [45] Wang Z, Zhang J, Jia C, et al. De Novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense tropical race 4 infection. *BMC Genomics* [Internet]. 2012;13:650.

Available from: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-650>.

- [46] Li C, Shao J, Wang Y, et al. Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *BMC Genomics* [Internet]. 2013;14:851. Available from: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-851>.
- [47] Bai T-T, Xie W-B, Zhou P-P, et al. Transcriptome and Expression Profile Analysis of Highly Resistant and Susceptible Banana Roots Challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. Zhang Z, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013;8:e73945. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0073945>.
- [48] Li C, Deng G, Yang J, et al. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *BMC Genomics* [Internet]. 2012;13:374. Available from: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-374>.
- [49] Van Den Berg N, Berger DK, Hein I, et al. Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Mol Plant Pathol* [Internet]. 2007;8:333–341. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2007.00389.x>.
- [50] Wang Y, Xia Q, Wang G, et al. Differential gene expression in banana roots in response to *Fusarium* wilt. *Can J Plant Pathol* [Internet]. 2017;39:163–175. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07060661.2017.1342693>.
- [51] Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* [Internet]. 1999;55:85–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0885576599902138>.
- [52] Finkina EI, Melnikova DN, Bogdanov I V., et al. Plant Pathogenesis-Related Proteins PR-10 and PR-14 as Components of Innate Immunity System and Ubiquitous Allergens. *Curr Med Chem* [Internet]. 2017;24. Available from:

- <http://www.eurekaselect.com/146732/article>.
- [53] Li W, Ge X, Wu W, et al. Identification of defense-related genes in banana roots infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Euphytica* [Internet]. 2015;205:837–849. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10681-015-1418-z>.
- [54] Boyes DC, Nam J, Dangl JL. The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1998;95:15849–15854. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.26.15849>.
- [55] Mackey D, Holt BF, Wiig A, et al. RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. *Cell* [Internet]. 2002;108:743–754. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286740200661X>.
- [56] Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, et al. *Arabidopsis* RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell* [Internet]. 2003;112:379–389. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867403000400>.
- [57] Hassoon AS. Review on the Role of Salicylic Acid in Plants. In: Nogueira IAAE-MHE-MCMTFE-MFE-TAR, editor. Rijeka: IntechOpen; 2020. p. Ch. 4. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.89107>.
- [58] Lefevre H, Bauters L, Gheysen G. Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Front Plant Sci* [Internet]. 2020;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.00338/full>.
- [59] Xu L, Zhu L, Tu L, et al. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *J Exp Bot* [Internet]. 2011;62:5607–5621. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/err245>.
- [60] Wen P-F, Chen J-Y, Wan S-B, et al. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth*

- Regul [Internet]. 2008;55:1–10. Available from:  
<http://link.springer.com/10.1007/s10725-007-9250-7>.
- [61] Saleem M, Fariduddin Q, Castroverde CDM. Salicylic acid: A key regulator of redox signalling and plant immunity. *Plant Physiol Biochem* [Internet]. 2021;168:381–397. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942821005210>.
- [62] Després C, Chubak C, Rochon A, et al. The Arabidopsis NPR1 Disease Resistance Protein Is a Novel Cofactor That Confers Redox Regulation of DNA Binding Activity to the Basic Domain/Leucine Zipper Transcription Factor TGA1. *Plant Cell* [Internet]. 2003;15:2181–2191. Available from:  
<https://academic.oup.com/plcell/article/15/9/2181-2191/6010104>.
- [63] Backer R, Naidoo S, van den Berg N. The NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1) and Related Family: Mechanistic Insights in Plant Disease Resistance. *Front Plant Sci* [Internet]. 2019;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00102/full>.
- [64] Jiang J, Ma S, Ye N, et al. WRKY transcription factors in plant responses to stresses. *J Integr Plant Biol* [Internet]. 2017;59:86–101. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jipb.12513>.
- [65] Wang Z, Jia C, Li J, et al. Activation of salicylic acid metabolism and signal transduction can enhance resistance to Fusarium wilt in banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). *Funct Integr Genomics* [Internet]. 2015;15:47–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10142-014-0402-3>.
- [66] Piasecka A, Jedrzejczak-Rey N, Bednarek P. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytol* [Internet]. 2015;206:948–964. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.13325>.
- [67] Pusztahelyi T, Holb IJ, Pócsi I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Front Plant Sci* [Internet]. 2015;6. Available from:  
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00573/abstract>.
- [68] Singh TR, Bansal A. Gene Duplication and Speciation. *Encycl Bioinforma Comput*



- Biol [Internet]. Elsevier; 2019. p. 965–974. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128096338201763>.
- [69] Albalat R, Cañestro C. Evolution by gene loss. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2016;17:379–391. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrg.2016.39>.
- [70] D’Hont A, Denoeud F, Aury J-M, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* [Internet]. 2012;488:213–217. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature11241>.
- [71] Cenci A, Hueber Y, Zorrilla-Fontanesi Y, et al. Effect of paleopolyploidy and allopolyploidy on gene expression in banana. *BMC Genomics* [Internet]. 2019;20:244. Available from:  
<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-5618-0>.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Proceso de construcción del comando de búsqueda de genes reportados como resistentes contra *Fusarium* sp.

<b>Línea de comando</b>	<b>N° resultados totales</b>	<b>N° solo nucleótidos</b>	<b>Observaciones</b>
(fusarium[All Fields] OR "fusarium sp"[All Fields]) AND resistance[All Fields]	144885	144416	Todas las coincidencias de "fusarium" y "resistencia"
(fusarium[All Fields] OR "fusarium sp"[All Fields]) AND resistance[All Fields] NOT Fusarium[Organism] NOT patent[All Fields] NOT synthetic[Organism]	137261	136809	Eliminación de secuencias del organismo Fusarium y secuencias sintéticas
(("Fusarium"[Organism] OR fusarium[All Fields]) AND resistance[All Fields]) NOT "Fusarium"[Organism] NOT patent[All Fields] NOT synthetic[Title] NOT truncated[Title] NOT partial[Title] NOT genome[Title] NOT assembly[Title] NOT scaffold[Title] NOT "synthetic construct"[Organism] NOT chromosome[Title] NOT putative[All Fields] NOT hypothetical[All Fields] NOT marker[All Fields]	135847	135438	Restricción de la búsqueda de secuencias genéticas reportadas como resistentes a Fusarium (eliminación de secuencias basura)
((fusarium[All Fields] AND resistance[All Fields]) NOT patent[All Fields] NOT synthetic[Title] NOT truncated[Title] NOT partial[Title] NOT genome[Title] NOT assembly[Title] NOT scaffold[Title] NOT "synthetic construct"[Organism] NOT chromosome[Title] NOT putative[All Fields] NOT hypothetical[All Fields] NOT marker[All Fields]) AND (txid4070[Organism] OR txid3700[Organism] OR txid3650[Organism] OR txid4637[Organism] OR txid4688[Organism] OR txid4527[Organism])	166	40	Restringir la búsqueda a organismos modelo (sin tener en cuenta el maíz o el trigo)

**Anexo 2.** Lista de genes reportados como resistentes a *Fusarium* sp. en varias especies (Lista A)

<b>Gen</b>	<b>Organismo</b>	<b>ID (Gen Bank)</b>	<b>Gen</b>	<b>Organismo</b>	<b>ID (Gen Bank)</b>
RGH9/Fom-1	<i>Cucumis melo</i>	JX295631	I-7	<i>Solanum pennellii</i>	KT185194
RGH10/Prv	<i>Cucumis melo</i>	JX295631	SRLK-5	<i>Solanum pennellii</i>	KP082943
RGH9/Fom-1	<i>Cucumis melo</i>	JX295632	SRLK-6	<i>Solanum pennellii</i>	KP082944
RGH10/Prv	<i>Cucumis melo</i>	JX295632	SRLK-4	<i>Solanum pennellii</i>	KP082942
Prv	<i>Cucumis melo</i>	JX295634	RFO1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DQ023268
Prv	<i>Cucumis melo</i>	JX295633	RFO1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_106616
FocBo1	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	AB981181	PAL3	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF594427
I2C-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	AF004878	NPR1C	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF582548
I2C-5	<i>Solanum pimpinellifolium</i>	AF408704	NPR1F	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF582551
I2C-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	AF004879	RGA2	<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>	XM_018825070
FocBo1	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	AB981182	CHS1	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF594422
RGC5	<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>	EU616674	CHS5	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF594426
I2GA	<i>Solanum tuberosum</i>	AY849384	CHS2	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF594423
I2GA	<i>Solanum tuberosum</i>	AY849385	ERF4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_112384
R3a	<i>Solanum tuberosum</i>	AY849382	CHS3	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF594424
I2	<i>Solanum lycopersicum</i>	AF118127	TGA4	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF582555
I2	<i>Solanum lycopersicum</i>	KR108299	GSTU5	<i>Lilium regale</i>	KM879340
I2GA	<i>Solanum tuberosum</i>	AY849383	PR1-3	<i>Musa acuminata</i> AAA Group	KF582558
RGC2	<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>	EU616673	Def1	<i>Petunia x hybrida</i>	HQ694498
R-FOM-2	<i>Cucumis melo</i>	DQ287965	Def2	<i>Petunia x hybrida</i>	HQ694499

**Anexo 3.** Lista de genes reportados como resistentes a *Fusarium* sp. en varias especies (Lista B)

<b>Gen</b>	<b>Organismo</b>	<b>ID (Gen Bank)</b>
RGC5	<i>Musa acuminata subsp. malaccensis</i>	EU616674
RGC2	<i>Musa acuminata subsp. malaccensis</i>	EU616673
PAL3	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF594427
NPR1C	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF582548
NPR1F	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF582551
RGA2	<i>Musa acuminata subsp. malaccensis</i>	XM_018825070
CHS1	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF594422
CHS5	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF594426
CHS2	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF594423
CHS3	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF594424
TGA4	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF582555
GSTU5	<i>Lilium regale</i>	KM879340
PR1-3	<i>Musa acuminata AAA Group</i>	KF582558

**Anexo 4.** Lista de genes asociados con la resistencia de Foc R4T en banano (Lista C).

Lista de genes diferencialmente expresados (DEG) extraídos de 4 artículos científicos que realizan un análisis comparativo del transcriptoma entre variedades de banano resistentes y susceptibles a Foc R4T

<b>Artículo</b>	<b>Gen</b>	<b>Nombre completo</b>	<b>ID*</b>
Sun et al. 2019. Plant Physiol Biochem. [19]	4CL	4-coumarate--CoA ligase 3	Ma02_g19720
	A20/AN1	Stress associated protein	Ma03_g10800
	ABF	BZIP domain-containing protein	Ma06_g17510
			Ma06_g32210
	bglB	Beta-glucosidase 25	Ma01_g20240
	bglB	Beta-glucosidase 1	Ma03_g30760
	CAD	EF-hand domain-containing protein	Ma04_g33010
	CaM	Calmodulin-like protein 11	Ma07_g01400
	CaM	Calmodulin	Ma06_g26100
	CCoAM	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	Ma08_g19800
			Ma09_g25700
	CDPK	Calcium-dependent protein kinase 15	Ma04_g24830
	CDPK	Calcium-dependent protein kinase 30	Ma02_g19440
	CDPK	Protein kinase domain-containing protein	Ma03_g19230
	CEBiP	Putative Chitin elicitor-binding protein	Ma04_g22540
	CHI10	Glyco_hydro_19_cat domain-containing protein	Ma09_g16070
	CHS	Type III polyketide synthase 3	Ma10_g12450
	CHS	Chalcone synthase 1	Ma06_g12370
	EBF1_2	F-box domain-containing protein	Ma04_g37200
			Ma09_g29140
ERF1	AP2/ERF domain-containing protein	Ma05_g22010	
ERF1	Ethylene-responsive transcription factor 1B	Ma04_g05560	

---

ETR	Ethylene receptor	Ma08_g12900 Ma11_g02040
HSP90	HATPase_c domain-containing protein	Ma01_g02910
IAA	Auxin-responsive protein IAA6	Ma03_g16590
IAA	Auxin-responsive protein	Ma04_g27640 Ma09_g02940
JAR1	Jasmonoyl--L-amino acid synthetase GH3.5	Ma04_g08500
JAZ	Tify domain-containing protein	Ma10_g03030
lap1	Plant intracellular Ras-group-related LRR protein 1	Ma03_g13420
LAX	Aa_trans domain-containing protein	Ma06_g27410 Ma11_g22520
LDOX	Fe2OG dioxygenase domain-containing protein	Ma05_g03850
MEKK1	Protein kinase domain-containing protein	Ma02_g09600
MEKK3	Protein kinase domain-containing protein	Ma09_g20020
MYC2	BHLH domain-containing protein	Ma04_g17530
NPR1	NPR1-like protein	Ma06_g02690
PI206	Dirigent protein	Ma06_g19170
POD	Peroxidase	Ma05_g31950 Ma10_g01510
POD52	Peroxidase 52	Ma02_g17270
POD59	Peroxidase	Ma02_g23580
PR1	SCP domain-containing protein	Ma02_g15050 Ma02_g15080 Ma04_g29630
PR1	Polyamine transporter RMV1	Ma04_g34790
PTI5	AP2/ERF domain-containing protein	Ma00_g00100
PTI6	AP2/ERF domain-containing protein	Ma07_g23450
PYR/PYL	Abscisic acid receptor PYL2	Ma10_g27910

---

RCHY1	E3 ubiquitin-protein ligase RZFP34	Ma08_g12680
RPK2	Protein kinase domain-containing protein	Ma03_g20500
RPM1	Putative Disease resistance protein RPM1	Ma09_g28690
RPM1	NB-ARC domain-containing protein	Ma06_g31500
RPPL1	disease resistance protein, Putative, expressed	Ma03_g23300
RPS2	NB-ARC domain-containing protein	Ma07_g08510
SIAH1	E3 ubiquitin-protein ligase SINAT5	Ma03_g08600 Ma03_g16640 Ma09_g05700
SKP2	F-box domain-containing protein	Ma06_g19950
SnRK2	Serine/threonine-protein kinase SAPK7	Ma11_g10390
TGA	Transcription factor HBP-1b(c38)	Ma08_g05650
UBE2C	UBIQUITIN_CONJUGAT_2 domain-containing protein	Ma03_g08640
UBE2D	UBIQUITIN_CONJUGAT_2 domain-containing protein	Ma07_g19070
UBE2H	UBIQUITIN_CONJUGAT_2 domain-containing protein	Ma04_g20430 Ma05_g13140
UBE2O	UBIQUITIN_CONJUGAT_2 domain-containing protein	Ma07_g26590
WRKY	Conserved hypothetical protein	Ma10_g14830
WRKY22	WRKY domain-containing protein	Ma10_g06870
WRKY28	WRKY domain-containing protein	Ma04_g15010
Zhang et al. 2019. Sci Rep. [20]		
ASP	Aspartyl protease family protein At5g10770	Ma03_g03840 Ma03_g03850 Ma03_g03870
ASP	Peptidase A1 domain-containing protein	Ma03_g11650
ASP	Aspartyl protease family protein At5g10771	Ma03_g03880
ASP	Aspartyl protease family protein At5g10772	Ma03_g03900
ASP	Aspartyl protease family protein At5g10773	Ma03_g03890

ASP	Peptidase A1 domain-containing protein	Ma01_g12710 Ma07_g16690
CHIT	Glyco_hydro_18 domain-containing protein	Ma08_g28490 Ma08_g28510 Ma08_g28520
CHIT	Putative Chitinase 6	Ma05_g17850
CHIT	Chitin-binding type-1 domain-containing protein	Ma05_g17860 Ma09_g20710
CHS	Chalcone synthase	Ma03_g01020
CHS	Chalcone synthase 5	Ma10_g20560
FAXDC	Fatty acid hydroxylase	Ma03_g01410 Ma08_g01290
GLIP	Lipase_GDSL domain-containing protein	Ma02_g12980 Ma02_g13020 Ma02_g13050 Ma04_g32380
KCS	3-ketoacyl-CoA synthase	Ma02_g23450 Ma03_g02070 Ma08_g31370 Ma10_g18030
NA	uncharacterized	Ma04_g13440
P450	Trimethyltridecatetraene synthase	Ma05_g26350
PGSIP7	Putative glucuronosyltransferase PGSIP7	Ma05_g13280
PGSIP8	Putative glucuronosyltransferase PGSIP8	Ma05_g15360 Ma08_g10890 Ma11_g04130
PGSIP8	Putative glucuronosyltransferase PGSIP8	Ma04_g20270
POD	Peroxidase 4	Ma06_g10290



	PPO	Polyphenol oxidase	Ma07_g03540 Ma08_g34740
	PR1	Pathogenesis-related 10	Ma08_g34150
	PR1	Bet_v_1 domain-containing protein	Ma08_g34160
	PR1	pathogenesis-related protein 1-like	Ma01_g19550
	PR1-3	Bet_v_1 domain-containing protein	Ma03_g08140 Ma03_g08150 Ma03_g08160 Ma09_g15840
	RPM1	Putative Disease resistance protein RPM1	Ma08_g31160
	RPP8L2	Putative disease resistance RPP8-like protein 2	Ma07_g21730
	RPP8L2	NB-ARC domain-containing protein	Ma07_g21750
	RPS2	NB-ARC domain-containing protein	Ma04_g35240
	WRKY22	WRKY domain-containing protein	Ma10_g06870
	WRKY23	Transcription factor WRKY33	Ma06_g23500
	WRKY25	WRKY transcription factor WRKY24	Ma06_g34370
	WRKY26	Putative AP2/ERF domain-containing protein	Ma03_g09270
	WRKY26	WRKY transcription factor WRKY24	Ma06_g01150
	WRKY26	WRKY transcription factor WRKY24-like	Ma08_g01650
	WRKY26	Transcription factor WRKY33	Ma11_g18140
	WRKY4	Putative WRKY transcription factor 4	Ma10_g03630
Li et al. 2020. <i>Funct Integr Genomics</i> . [21]	ARF5	Auxin response factor 5	Ma01_g13320
	CDS1	Phosphatidate cytidyltransferase 1-like	Ma03_g24320
	Cf-9	Cf-9 rapidly elicited protein-like	Ma09_g01660
	CHIB1	Putative Acidic endochitinase	Ma03_g33620
	CIPK4	CBL-interacting protein kinase 4	Ma06_g26140
	CIPK7	CBL-interacting protein kinase 7	Ma02_g19290

---

CML29	Calmodulin-related calcium sensor protein, expressed	Ma03_g07180
CSLE6	Cellulose synthase-like protein E6	Ma09_g20060
CTL1	Chitin-binding type-1 domain-containing protein	Ma01_g02630
CYP709B2	Cytochrome P450 709B2	Ma11_g00340
CYP71A1	Cytochrome P450 71A1	Ma01_g14620
		Ma05_g28100
CYP71D55	Premnaspirodiene oxygenase	Ma05_g28110
		Ma11_g24880
DIR1	Lipid-transfer protein DIR1	Ma10_g17100
DIR11	Dirigent protein 11	Ma09_g10850
DIR23	Dirigent protein 23	Ma03_g22920
ECAD1	Defensin Ec-AMP-D1-like	Ma04_g36140
EFTU	GTP_EFTU_D3 domain-containing protein	Ma03_g22980
		Ma02_g12840
EGAD1	Defensin EGAD1	Ma08_g13660
EXPA11	Expansin-A11-like	Ma02_g05480
FAH1	Dihydroceramide fatty acyl 2-hydroxylase FAH1-like	Ma02_g12620
GOS9	Putative Jacalin-related lectin 19	Ma08_g20300
GSTU18	Glutathione S-transferase U18	Ma05_g10100
GSTU25	Glutathione S-transferase U25	Ma09_g26550
MIK1	MDIS1-interacting receptor like kinase 2	Ma05_g12930
MYB39	Transcription factor MYB39-like	Ma02_g06670
		Ma02_g23080
NA	uncharacterized	Ma03_g16750
		Ma04_g08410
		Ma08_g33310
NA	Ripening-related protein 1	Ma02_g12510

---

OMT2	Tricetin 3',4',5'-O-trimethyltransferase	Ma02_g06360 Ma09_g18140
PCR1	Protein PLANT CADMIUM RESISTANCE 8	Ma05_g25340
PEX13	peroxisomal membrane protein 13-like	Ma02_g19100
RAV1	AP2/ERF and B3 domain-containing transcription factor RAV1-like	Ma09_g21950
RD22	BURP domain protein RD22	Ma05_g09070
RGA2	CC-NBS-LRR resistance protein	Ma06_g23910
RGA3	CC-NBS-LRR resistance protein	Ma03_g28850
RGA4	Disease resistance protein RGA4	Ma01_g07540
RIN4	RPM1-interacting protein 4	Ma00_g03070 Ma03_g12680 Ma07_g03660
RPP13L1	Disease resistance RPP13-like protein 1	Ma03_g23300 Ma06_g33720
SAG12	Senescence-specific cysteine protease	Ma06_g15140
SDHB	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	Ma11_g17560
SRG1	Protein SRG1-like	Ma11_g04300
STIG1	Putative Stigma-specific STIG1-like protein 2	Ma02_g21220
STR16	Thiosulfate sulfurtransferase 16, chloroplastic-like	Ma08_g34500
TEF1	Tr-type G domain-containing protein	Ma02_g20820
UGT73C6	UDP-glycosyltransferase 73C6-like	Ma10_g28380
XTH7	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 7	Ma03_g27400 Ma08_g04960
ACA7	Alpha carbonic anhydrase 7-like	Ma03_g06990 Ma05_g05480
At1g74360	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	Ma10_g11870

Niu et al. 2018. Int J Mol Sci. [22]

At4g2719	disease resistance protein At4g27190-like	Ma01_g03970
AtBP2	Luminal-binding protein 2	Ma03_g28340 Ma09_g24180
CURS3	Curcumin synthase 3-like	Ma10_g20600 Ma10_g20590
JUB1	Transcription factor JUNGBRUNNEN 1-like	Ma07_g00860
LOB	LOB domain-containing protein 41-like	Ma04_g03810
NA	uncharacterized	Ma01_g23660 Ma05_g10700 Ma05_g10710
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase-like	Ma11_g14940
PERK3	Proline-rich receptor-like protein kinase PERK3	Ma04_g22180 Ma04_g32260
PR1	Pathogenesis-related protein 1-like	Ma02_g15060
RPP13L4	Disease resistance RPP13-like protein 4	Ma09_g11730
UGT73C6	UDP-glycosyltransferase 73C3-like	Ma04_g26840 Ma04_g26850
WRKY1	Probable WRKY transcription factor 50	Ma07_g09530
WRKY40	Putative WRKY transcription factor 40	Ma10_g03640

\*ID se basa en las anotaciones del genoma del banano (versión 2)



**Anexo 5.** Lista de cebadores utilizados durante el experimento

Gen	Nombre	Cebador 1 (C1)	Tm (C1)	GC% (C1)	Cebador 2 (C2)	Tm (C2)	GC% (C2)	Longitud del producto
PR1	Pathogenesis-related protein 1	GGTGGGGGATGTGTGTTGAA	60.18	55.00	TATCCGAGACAGAGAGCATGCAG	61.86	52.17	181
CHS	Chalcone synthase	TGTTCCGGTGAGTACGGGAAC	59.69	55.00	AACCCTATTAGAGGGCGACG	58.96	55.00	189
RPM1	Disease resistance protein RPM1	ACCTGCACTATCTGGGGCTA	60.03	55.00	CTGAGAGCCAGCAGGTATCG	59.97	60.00	163
RIN4	RPM1-interacting protein 4	GGACCCGAAATCAGCAGGAT	59.82	55.00	CGTAGGCATGGGAATAGCCC	60.32	60.00	260
RPS2	Disease resistance protein RPS2	GAATCGGGCTGGTAGAAGCA	59.82	55.00	TGCTGAAGAAGCCATTCGGT	59.96	50.00	174
WRKY22	WRKY transcription factor 22	ACGAGCTCCTCCAGAAGTGG	61.25	60.00	GTCCCCACAATCGAACTCCC	60.39	60.00	176
NPR1	Regulatory protein NPR1	CAGAAATCACTGGCCTCGGA	59.75	55.00	TTCGGGCAAACCTTGTCGAT	60.25	50.00	178
TGA4	Transcription factor TGA4	TCGCAGGATCTCGAGTTCAAATA	59.62	43.48	ACGATTGATGATGCCCTGT	59.45	50.00	156
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	CATGAACAAGGGGACCGACA	59.96	55.00	AGGCAATGTGTTTCCCGACT	59.89	50.00	260
RGC5	Resistance gene candidate 5	GTGCTGAACTGTTGTGGCTG	59.97	55.00	TTGTGTAGGCATCCAGGCAG	60.04	55.00	199
RGC2	Resistance gene candidate 2	GGAGGTGATGATTGGCCCTT	59.74	55.00	GCCAATCGAAGTCCTTGAAGC	59.87	52.38	707
TUBB	Tubulin beta chain	GGAGAACTGCGATTGCTTGC	60.18	55.00	TGAACGGACAGTGTGGCATT	60.18	50.00	1110
ACT3	Actin-3	GTTCCATGGTCCCCAAGTCA	59.60	55.00	AGCAGTGATGTTATGGCAGT	57.20	45.00	173