



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

**“TECNOLOGÍAS DE ARNi COMO NUEVAS ALTERNATIVAS PARA EL
CONTROL DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*”**

**Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magíster en
Biociencias Aplicadas con Mención en Biodescubrimiento**

Presentado por: Ricardo Humberto Pacheco Coello

Guayaquil – Ecuador

2024

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la salud y la sabiduría para culminar este trabajo. Agradezco al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), por haberme brindado el espacio para realizar esta investigación. En especial al Ph. D. Juan Manuel Cevallos director del CIBE y a la Ph. D. Daynet Sosa ex directora del CIBE, por su apoyo. A mi tutor y coordinador del área de Biología Molecular el Ph. D. Pablo Chong por su guía y enseñanzas durante el desarrollo de esta tesis, además por brindarme la oportunidad de involucrarme en este interesante proyecto de investigación y que formara parte de mi trabajo de titulación. A mi cotutora, la Ph. D. María Eulalia Vanegas, por su apoyo y guía durante mis pasantías en el Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca, y por su amabilidad y su disposición para ayudarme en el progreso de esta investigación. Al Programa de maestría Vllir Network, incluyendo a sus autoridades, Administrativos, profesores, en especial al Ph. D. Paolo Piedrahita Coordinador de la Maestría en Biociencias Aplicadas. Al personal del laboratorio de Biología Molecular, en especial al Ph. D. Julio Bonilla y al Ph. D. Efrén Santos quienes me brindaron su apoyo con sus conocimientos en el desarrollo de esta investigación. Quedo eternamente agradecido con el apoyo incondicional de mi esposa e hija quienes son el pilar fundamental de mi vida y la fuerza que me motiva para alcanzar mis metas, sin ellas no hubiese podido culminar este gran objetivo profesional. A mis padres y mis hermanos, por estar siempre conmigo cuando los necesito.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mi amada esposa Rosa y a mi hermosa hija Paulita.

A mis padres Bolívar y Norma.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

María Isabel Jiménez, Ph.D.
Presidenta.

Pablo Chong Aguirre, Ph.D.
Tutor.

María Eulalia Vanegas, Ph.D.
Cotutor.

Efrén Santos Ordoñez, Ph.D.
Evaluador.

Julio Bonilla Jaime, Ph.D.
Evaluador.

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

Ricardo Humberto Pacheco Coello

RESUMEN

En la producción agrícola, el constante uso de fungicidas convencionales para el control de hongos patógenos genera problemas de resistencia adquirida que, a su vez, ocasiona serios daños ambientales y un incremento anual de los costos de producción. Una de las principales amenazas para el cultivo del banano es la fusariosis, provocada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). Se requiere de nuevas alternativas eficientes para el control de enfermedades. Una de ellas es la aplicación de la tecnología ARN de interferencia (ARNi) en la que una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc) se puede utilizar para activar el mecanismo de silenciamiento genético en el individuo deseado. En este estudio se evaluó el mecanismo de ARNi en Foc raza 1 efectuándose ensayos a nivel in vitro e invernadero. Se consideraron tres genes objetivos para sintetizarlos en ARNdc, basándose en la secuencia de los genes de FocR1: *Beta tubulina (Foc β -tub)*, *C5 – Esterol desaturasa (FocERG3)*, *Quitina sintasa 1 (FocChs1)*, adicionalmente el gen *adenilato ciclasa (FocAdcy)* fue utilizado como un control positivo en la evaluación de la inhibición a través de ensayos de germinación de esporas en placas Petri. Se calculó el IC₅₀ de cada gen objetivo considerando 4 dosis del ARNdc. Adicionalmente se determinó la translocación de la molécula de ARNdc en plántulas de banano aplicadas en la hoja número 3, evaluándose a 1, 12, 24 y 48 horas post aplicación (hpa) mediante la técnica de Northern blot. Finalmente, para formulaciones futuras, se determinó un ratio de intercalación entre el ARNdc y nanopartículas de hidróxido dobles en capas (LDH por sus siglas en inglés) como acarreadores para posibles aplicaciones en campo. Los resultados demostraron que el ARNdcFocChs1 fue más efectivo para la inhibición de esporas con un IC₅₀ promedio de 156.84 mg/L superando a ARNdcFoc β -tub (IC₅₀: 532.7 mg/L), ARNdcFocERG3 (IC₅₀: 635.59 mg/L) e incluso al control ARNdcFocAdcy (IC₅₀: 243.91 mg/L). En relación con la translocación de la molécula, se observó que hasta las 48 hpa, el ARNdc permanecía sin degradación; sin embargo, no se detectó translocación a otros tejidos de la plántula de banano hasta el último punto de evaluación. Finalmente, se demostró que el ARNdcFoc β -tub sintetizado de forma invitro puede ser intercalado con sustancias no tóxicas y de fácil degradación como las nanopartículas LDH a una relación del ratio de sus masas de 1:15, lo cual permitiría transportar y proteger el ARNdc en condiciones de campo.

ABSTRACT

In agricultural production, the constant use of conventional fungicides to control pathogenic fungi generates problems of acquired resistance which, in turn, causes serious environmental damage and an annual increase in production cost. One of the main threats to banana crop is fusariosis, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc). New efficient alternatives are required for disease control. One of them is the application of RNA interference (RNAi) technology, where a double-stranded RNA (dsRNA) molecule can be used to activate the genetic silencing mechanism in the desired individual. In this study, the RNAi mechanism was evaluated in Foc race 1, carrying out in vitro and greenhouse test. Three target genes were considered to be synthesized into dsRNA, based on the sequence of FocR1 genes: *Beta tubulin* (*Foc β -tub*), *C5-Esterol desaturase* (*FocERG3*), *Chitin synthase 1* (*FocChs1*), additionally, *adenylate cyclase* gene (*FocAdcy*) was used as a positive control in the evaluation of inhibition through spore germination assays in Petri dishes. The IC₅₀ of each target gene was calculated considering 4 doses of the dsRNA. Additionally, the translocation of the dsRNA molecule was determined in banana seedlings, applied on leaf number 3, evaluating it at 1, 12, 24 and 48 hours post application (hpa) using the Northern blot technique. Finally, for future formulations, an intercalation ratio was determined between dsRNA and layered double hydroxide (LDH) nanoparticles as carriers for possible field applications. The results demonstrated that dsRNA_{FocChs1} was more effective for spore inhibition with an average IC₅₀ of 156.84 mg/L, surpassing dsRNA_{Foc β -tub} (IC₅₀: 532.7 mg/L), dsRNA_{FocERG3} (IC₅₀: 635.59 mg/L) and even to control dsRNA_{FocAdcy} (IC₅₀: 243.91 mg/L). In relation to the translocation of the molecule, it was observed that up to 48 hpa, the dsRNA remained without degradation, however, no translocation to other tissues of banana seedling was detected until the last evaluation point. Finally, it was demonstrated that the dsRNA_{Foc β -tub} synthesized in vitro can be intercalated with non-toxic and easily degraded substances such as LDH nanoparticles at a mass ratio of 1:15, which would allow the dsRNA to be transported and protected in field conditions.

ÍNDICE GENERAL

Pág.

AGRADECIMIENTO	II
DEDICATORIA.....	II
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN	III
DECLARACIÓN EXPRESA	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT.....	VI
ÍNDICE GENERAL	VII
ABREVIATURAS.....	X
SIMBOLOGÍA.....	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
INDICE DE TABLAS.....	3
INDICE DE ECUACIONES	4
CAPÍTULO 1	5
1. Introducción y objetivos	5
1.1. Justificación	5
1.2. Antecedentes	5
1.3. Objetivo general	7
1.4. Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO 2	8
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1. El banano	8
2.2. Influencia del banano en la economía ecuatoriana	8
2.3. Enfermedades que impactan la economía del cultivo del banano.....	9
2.3.1. Fusarium oxysporum (Foc).....	9
2.3.2. Pseudocercospora fijiensis	10
2.3.3. Ralstonia solanacearum	11
2.3.4. Virus del cogollo racimoso del banano (BBTV) y virus del rayado del banano (BSV).....	12

2.4.	Efecto del control químico de patógenos sobre el cultivo del banano y la salud humana	12
2.5.	Mecanismo del ARN de interferencia (ARNi) y su uso potencial en la agricultura	13
2.6.	Manejo de las enfermedades de banano mediante ARNi	14
2.7.	Nanopartículas para la entrega del ARNdc en la protección de los cultivos	15
CAPÍTULO 3		16
3.	Metodología	16
3.1.	Ubicación del estudio.....	16
3.2.	Obtención del inóculo.....	16
3.3.	Caracterización molecular	17
3.3.1.	Genes objetivos	17
3.3.2.	Diseño de primers de los genes objetivos	19
3.3.3.	Extracción de ADN.....	21
3.3.4.	PCR punto final	21
3.3.5.	Síntesis de ARNdc.....	21
3.4.	Bioensayo de inhibición con ARNdc sobre esporas del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> de la raza 1	22
3.4.1	Diseño experimental del bioensayo de inhibición	23
3.4.2	Cálculo del porcentaje de inhibición del patógeno.....	23
3.4.3	Cálculo del IC50	24
3.5.	Análisis de la translocación del ARNdc en plántulas de banano	24
3.5.1.	Diseño experimental del ensayo de translocación	24
3.5.2.	Obtención de la molécula del ARNdc para ensayo de translocación ...	25
3.5.3.	Extracción de ARN total de tejidos de banano.....	25
3.5.4.	Northern Blot.....	26
3.6.	Síntesis de nanopartículas LDH e intercalación con el ARNdc.....	27
3.6.1	Síntesis de nanopartículas LDH	27
3.6.2	Intercalación Nanopartículas/ARNdc	28
CAPÍTULO 4		29
4.	Resultado y discusión	29
4.1.	Inhibición de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i> cubense</i> de la raza 1 ..	29

4.2. Comparación de los niveles del IC50	33
4.3. Translocación de la molécula de ARNdc en tejidos de banano.	36
4.4. Optimización del ratio de intercalación de ARNdc-Foc β -tub – nanopartículas LDH.....	38
CAPÍTULO 5	41
5. Conclusiones y Recomendaciones	41
5.1. Conclusiones	41
5.2. Recomendaciones	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS	53

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ago	Proteína Argonauta
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNdc	Ácido Ribonucleico de doble cadena
ARNi	Ácido Ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BBTV	Virus como el cogollo racimoso del banano (por sus siglas en inglés)
BSV	Virus del rayado del banano
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
DCA	Diseño completamente al azar
EPA	Agencia de Protección Ambientales de Estados Unidos (por sus siglas en inglés)
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FAO	Organización para la agricultura y la alimentación (por sus siglas en inglés)
Foc	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>FocAdcy</i>	<i>Fusarium oxysporum adenilato ciclasa</i>
<i>FocChs1</i>	<i>Fusarium oxysporum Quitina sintasa 1</i>
<i>FocERG3</i>	<i>Fusarium oxysporum C5 – Esterol desaturasa</i>
FocR1	<i>Fusarium oxysporum</i> raza 1
FocRT4	<i>Fusarium oxysporum</i> raza Tropical 4
Foc β -tub	<i>Fusarium oxysporum Beta tubulina</i>

HIGS	Silenciamiento genético inducido por el huésped (por sus siglas en inglés)
HPA	Horas Post Aplicación
IC50	Concentración Inhibitoria media (por sus siglas en inglés)
LDH	Hidróxido dobles en capas (por sus siglas en inglés)
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería
M. O. A	Mecanismo de acción (por sus siglas en inglés)
OGM	Organismo Genéticamente Modificado
PAN	Red de Acción de Pesticidas de Europa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (por sus siglas en inglés)
PIB	Producto Interno Bruto
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN (por sus siglas en inglés)
SIGS	Silenciamiento genético inducido por rocío (por sus siglas en inglés)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (por sus siglas en inglés)
UC	Universidad de Cuenca
VAB	Valor Agregado Bruto
VCG	Grupo de compatibilidad vegetativa (por sus siglas en inglés)

SIMBOLOGÍA

\$	dólar estadounidense
%	porcentaje
°C	grado centígrado
μl	microlitro
cm	centímetro
g	gramo
h	hora
ha	hectare
L	litro
M	molar
mg	miligramo
min	minuto
mM	milimolar
ng	nanogramo
nM	nanomolar
p/p	peso sobre peso
Pb	pares de base
pg	picogramo
pH	potencial de hidrógeno
RPM	revoluciones por minuto

s	segundo
t	tonelada
V	voltio

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Amplificación por PCR de los genes objetivos del aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1. M: Marcador de peso molecular de 1kb; Línea 1: *adenilato ciclasa* (660 pb); Línea 2: *Quitina sintasa 1* (620 pb); Línea 3: *Beta tubulina* (614 pb); Línea 4: *C5 – Esterol desaturasa* (622 pb). 22
- Figura 2.** Determinación de la eficiencia de la sonda de ARN. A al E corresponden a diferentes reacciones de la generación de sondas con producto de la RT-PCR de FocAdcy. Los números indican la capacidad de detección mediante el digoxigenina-11-UTP de acuerdo con la dilución del ARN. 26
- Figura 3.** Curva de inhibición de los ARNdc a concentraciones de 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L y 1500 mg/L sobre esporas del aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1. (a) Curva de inhibición de *ARNdc-FocChs1*. (b) Curva de inhibición de *ARNdc-FocB-tub*. (c) Curva de inhibición de *ARNdc-FocERG3*. (d) Curva de inhibición de *ARNdc-FocAdcy*. 30
- Figura 4.** Inhibición de ARNdc a 1000 mg/L sobre el aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1. con ARNdc-FocChs1, ARNdc-FocB-tub, ARNdc-FocERG3 y ARNdc-FocAdcy. 31
- Figura 5.** Gráfico de barras de la inhibición de esporas con ARNdc-FocChs1, ARNdc-FocB-tub, ARNdc-FocERG3 y ARNdc-FocAdcy a 1500 mg/L sobre esporas del aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1. Las barras representan el error estándar. Las letras iguales sobre las barras no son significativamente diferentes a $p > 0.05$ 32
- Figura 6.** Diagrama de cajas de la Concentración Inhibitoria media (IC50) en mg/L con ARNdc-FocChs1, ARNdc-FocAdcy, ARNdc-FocB-tub y ARNdc-FocERG3, sobre el aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1. Se consideraron 9 observaciones por cada gen. Las barras representan el error estándar. 35
- Figura 7.** Detección de ARNdc por Northern blot en muestras de tejido de banano a 1, 12, 24 y 48 horas post aplicación, h3 corresponde a la hoja # 3 de la plántula de banano. Ctrl, corresponde al control del ARNdc (500 mg/L) con 1% Triton + 1% DMSO. Las muestras de cada punto del tiempo evaluado fueron procesadas de forma individual, a excepción de aquellas correspondientes a 24 y 48 horas post-aplicación (hpa), las cuales fueron analizadas conjuntamente en un único experimento de Northern blot. 37
- Figura 8. Intercalación del ARNdc en nanopartículas LDH y caracterización LDH. a,** Intercalación del ARNdc-Foc β -tub y nanopartículas de hidróxido dobles en capas de MgAl (LDH) a ratios de la masa de 1:5, 1:7, 1:9, 1:10, 1:15 y 1:20 (p/p), correspondientes a las líneas 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente. M: Marcador de peso molecular de 1kb. Línea 1 ARNdc,

Línea 2 ARNdc/PVP. Línea 9 LDH. El ARNdc al intercalarse con LDH no migra durante la electroforesis y puede observarse la fluorescencia en el pocillo (como lo indican las flechas). La intercalación completa logró realizarse en un ratio en relación a la masa ARNdc-LDH de 1:15 (Línea 7). **b**, imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas LDH. **c**, Distribución del tamaño de las nanopartículas LDH.39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los genes objetivos para el silenciamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i> de la raza 1.	18
Tabla 2. Primers para obtención del ARN de doble cadena con respecto a <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i> de la raza 1	20
Tabla 3. Descripción de los tratamientos aplicados en el bioensayo de inhibición	23
Tabla 4. Descripción del ensayo de translocación de la molécula de ARNdc	25
Tabla 5. Estimación de la concentración de ARN mediante dilución con respecto a la sonda D	27
Tabla 6. Prueba de diferencia menos significativa (LSD) de Fisher con el IC50 de los genes objetivos para la inhibición de EC35-G-GM1 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i> de la raza 1	34

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de inhibición de colonias de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> de la raza 1.	23
---	----

CAPÍTULO 1

1. Introducción y objetivos

1.1. Justificación

Los pesticidas químicos provocan un impacto negativo en la salud humana y el ambiente (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Además el uso continuo de moléculas de un solo modo de acción (MOA) genera resistencia en las poblaciones de los patógenos (Chong et al., 2019; Diaz-Trujillo et al., 2018; Hawkins et al., 2019; Pimentel & Burgess, 2014). En Ecuador, la aplicación en toneladas de pesticida ha incrementado de 6,472 en el año 2013 a 60,733 en el año 2018 (FAOSTAT, 2021). El banano es uno de los principales cultivos agrícolas de exportación para el país, siendo el control de enfermedades con pesticidas lo que predomina (Romero-Estévez et al., 2019). Una alternativa para un manejo sostenible y el control de patógenos, es la aplicación de tecnologías de silenciamiento de genes por medio de la inhibición postranscripcional del ARN mensajero (ARNm) (Cagliari et al., 2019; Majumdar et al., 2017a). El estudio de esta tecnología permitiría establecer métodos efectivos para el control de *Fusarium oxysporum* reduciendo el uso de pesticidas, el cual podría ser un punto inicial para generar un producto de alto impacto en el mercado de insumos agrícolas.

1.2. Antecedentes

La práctica agrícola se vuelve cada vez más desafiante debido al complejo control de enfermedades y plagas que provocan pérdidas en los cultivos y daños irremediables a la salud humana (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016; Oerke, 2006). Además, está en una constante amenaza debido a la resistencia que adquieren los patógenos en el control químico (Bass et al., 2015; Chong et al., 2019; Lucas et al., 2015). El uso de pesticidas generan un incremento anual en los costos de producción, en el año 2020 se estimó un incremento de 3.5 millones de toneladas en el uso de plaguicidas (W. Zhang, 2018) (Sharma et al., 2019). Según datos de la Agencia de Protección Ambientales de Estados Unidos (EPA) en el año 2012 estos gastos significaron una inversión de \$56 mil millones a nivel mundial, donde el 55% de los gastos corresponden al uso de insecticidas y fungicidas, incrementándose en un 5.64% desde el 2010 (US EPA, 2015). En el Ecuador, el banano representa uno de los principales factores de ingreso económico, con una aportación en el año 2019 del 2% del PIB y el 35% al PIB agropecuario, lo que representó un ingreso de \$3,100 millones para el país (Banco Central del Ecuador, 2020).

Una de las principales amenazas para el cultivo del banano es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causante de la fusariosis en banano, siendo de la enfermedad con mayor impacto a nivel mundial, debido a que la cepa raza 1 (FocR1) casi lleva a la extinción de la variedad de banano ‘Gros Michel’. Actualmente la Variedad “Williams” perteneciente al subgrupo Cavendish el cual es la de mayor importancia económica debido a que se le atribuye el 45% de la producción mundial de banano y además es resistente a Foc raza 1, es amenazada por la raza tropical 4 (RT4), siendo esta cepa la más destructiva del hongo (R. Ploetz, 2015). La Fusariosis por FocRT4, provoca considerables daños al cultivo del banano. El patógeno ingresa a la planta a través de las raíces, bloquea los haces vasculares y luego provoca la pudrición del pseudotallo ocasionando la muerte de la planta (F. García-Bastidas et al., 2013; Guo et al., 2014; R. Ploetz, 2015). En la actualidad, no es posible controlar Foc con fungicidas químicos (Orr & Nelson, 2018).

De acuerdo con la constitución Ecuatoriana, en el artículo 401 se prohíbe la siembra y manipulación de cultivos transgénicos (CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR, 2008). Por lo tanto, en este país no es posible la obtención de una variedad de banano genéticamente modificado (OGM) con características que brinden la capacidad de tolerar enfermedades. Por otro lado, el impacto negativo del uso de pesticidas, la falta de un método en el control de FocRT4 ante un posible ingreso al país y la escasa información relacionada con el control de patógenos de banano con la aplicación del mecanismo de ARNi no transgénico a nivel de campo o invernadero motiva el desarrollo de esta investigación, que se centra en la aplicación de ARNdc para el silenciamiento de genes que sean imprescindibles para la virulencia y desarrollo de los patógenos seleccionados (Dang et al., 2014).

La tecnología ARNi puede ser utilizada como un método sostenible para el control de plagas y enfermedades sin la necesidad de realizar cultivos transgénicos (Cagliari et al., 2019). El proceso de silenciamiento comienza cuando se introduce un ARNdc específico para el hospedero en sus células. El ARNdc a su vez es cortado por una enzima llamada “Dicer” en pequeños fragmentos de nucleótidos de 21 – 25 pb, llamados ARN de interferencias cortos (ARNi), luego una de las hebras de ARN (la que va en dirección anti sentido de 3´ a 5´) se adhiere a una proteína llamada argonauta (Ago) y sirve como guía para formar un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) siendo capaz de intervenir en el proceso de la traducción, degradando el ARN mensajero (ARNm) o eliminando por completo la expresión de genes de interés (Borges & Martienssen, 2015a; Fire et al., 1998; H. Li et al., 2015). Estudios preliminares han demostrado que es posible inhibir el crecimiento de hongos patógenos del cultivo del banano como *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y *Pseudocercospora fijiensis* (Ghag et al., 2014; Mumbanza et al., 2013b).

De los estudios desarrollado por Mumbanza (2013) se conoce que los genes que han presentado mayor relevancia en la inhibición del desarrollo del patógeno son Adenilato ciclasa, ADN polimerasa subunidad alfa y ADN polimerasa subunidad delta. Estos estudios sólo se centraron en la evaluación in vitro, mientras que en el presente trabajo se pretende realizar un ensayo a nivel de invernadero para determinar la translocación del ARNdc en la planta. Con el desarrollo de esta investigación se pretende evaluar al menos tres modelos de ARNdc establecidos en los genes objetivos para la inactivación de la virulencia o crecimiento de los patógenos, midiendo la eficiencia de todos los ARNdc aplicados.

1.3. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de la técnica de ARNi para el control del hongo patógeno del banano *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 mediante ensayos in vitro y la translocación del ARNdc en plántulas de banano a nivel de invernadero.

1.4. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de inhibición de ARNdc en la germinación de esporas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 mediante ensayos in vitro
- Evaluar la translocación del ARNdc en diferentes tejidos de plántulas de banano sobre su aplicación foliar en condiciones de invernadero.
- Evaluar la viabilidad de intercalación del ARNdc con nanopartícula laminares como carrier para su posible aplicación en plantas de banano en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

2.1. El banano

El banano cuyo nombre científico está definido como *Musa x acuminata*, es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las musáceas y del orden Zingiberales. Produce una fruta que posee un alto valor nutricional y sabor agradable cuando se encuentra en su estado de madurez con un tono amarillo, siendo una de las preferidas a nivel mundial por su aporte de vitaminas, energía y potasio. Se conoce que su sitio de origen es en el sudeste asiático en Nueva Guinea (Gonzabay, 2017; Muthee et al., 2019). El banano es una de las frutas de mayor importancia económica a nivel mundial debido a la alta demanda de consumo a nivel global, en el 2017 el negocio del banano representó alrededor de 11 billones de dólares en exportaciones, siendo América latina y el caribe las regiones que mayormente exportan esta fruta representando el 80% de las exportaciones mundiales, además de representar una fuente importante de empleo (Voora et al., 2020).

Al momento se conoce que existe alrededor de 1000 variedades de bananas, muchas de ellas propagadas de forma vegetativas, sobre todo los bananos cultivables, debido a la característica de que son paternocárpicos, es decir poseen una fruta sin semillas o estériles, la variedad que mayormente se comercializa es la Cavendish, el cual representa el 47% de la producción mundial por las características fenotípicas y genotípicas que posee para la producción del fruto (FAO, 2023a)

2.2. Influencia del banano en la economía ecuatoriana

El Ecuador destaca por ser un país con mayor producción de banano y uno de los más importantes exportadores a nivel mundial, sobre todo en Rusia, Estados Unidos y la Unión Europea (Evans & Ballen, 2021; Orozco Vásquez, s. f.). En el 2017 se reportó que el Ecuador lideró los ingresos en las exportaciones de banano a nivel mundial con aportes alrededor de 3 billones de dólares, seguido de Costa Rica (\$ 1.1 billón) y las Pilipinas (\$ 1 billón) (Voora et al., 2020). En el 2021 se obtuvo una participación de exportación mundial de banano del 24.6% lo que representó un aumento a 3.5 billones de dólares figurando el 18.1 % de los valores de exportaciones no petroleras, además, de acuerdo con las cifras que muestra el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) hasta mayo del 2022 el banano aportó con el 17.4% del Valor Agregado Bruto (VAB) agropecuario y una generación de divisas de 3,272 millones de dólares (FAO, 2023b; MAG, 2022; Mosquera et al., 2023). Ecuador, a pesar de ser el primer exportador de

banano en cuanto a la producción se sitúa en el puesto quinto a nivel mundial y en segundo lugar en latino américa, siendo así que se traduce en la generación de 115,698 empleos a lo largo de la cadena de producción bananera (MAG, 2022). La superficie cosechada de banano en el 2021 a nivel nacional fue de 164,085 ha con una producción de banano de exportación de 6,684,916 t, alcanzando un rendimiento histórico de 40.74 t/ha y aumentado su producción en un 10.98% con respecto al año anterior, las provincias productoras más representativas son: Los Ríos (2,571,356 t), Guayas (2,098,274 t) y el Oro (1,502,098 t) (Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2022). No obstante, alrededor de 273 ha de banano se han visto afectadas por diferentes causas, entre ellas, una quinta parte es por enfermedades y plagas, lo que resulta una merma en la producción, siendo la Sigatoka negra y el moko del banano las enfermedades que más han afectado al banano Ecuatoriano (Mosquera et al., 2023; Zumba, 2022)

2.3. Enfermedades que impactan la economía del cultivo del banano

El banano se ve afectado por una gran variedad de enfermedades y plagas que reducen la producción de su fruta además de la muerte, provocando pérdidas económicas de los productores y convirtiéndose en gran desafío al momento de la exportación de su fruto (R. C. Ploetz et al., 2015). Muchas de estas enfermedades son causadas por factores bióticos como bacterias, hongos, nemátodos y virus, promoviendo el desarrollo de programas de manejo de enfermedades a nivel mundial e incrementando el costo de producción bananera (D. Jones, 2000). En la actualidad la exportación bananera se ve amenazada principalmente por enfermedades emergentes como la provocada por el hongo *Fusarium oxysporum*, en especial por la raza 4 tropical, provocando un marchitamiento vascular en la planta; la Sigatoka negra causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis* el cual ataca al área foliar de la planta reduciendo su capacidad fotosintética; por otro lado, la enfermedad causada por la bacteria *Ralstonia solanacearum* es otras de las amenazas para productores bananeros dado que produce una podredumbre llamada el moko del plátano que afecta el sistema vascular; los virus como el cogollo racimoso del banano (BBTV) y el virus del rayado del banano (BSV) también representa un impacto económico debido a que afecta al todo el sistema de la planta incluyendo los hijos e inclusive no desarrollándose el fruto o racimos (R. C. Ploetz & Evans, 2015).

A continuación, se realiza una descripción de las principales enfermedades que afectan a la producción bananera:

2.3.1. *Fusarium oxysporum* (Foc)

La fusariosis o el mal de Panamá es una de las enfermedades policíclica de mayor relevancia en la producción bananera. Provoca un daño en el sistema vascular de la

planta haciendo que se dificulte el paso de los nutrientes hacia diversos tejidos. Logra esparcirse desde la raíz hasta observarse un amarillamiento en el área foliar. El hongo se encuentra en el suelo y puede ser diseminado a través del agua y materiales de laboreo que no han sido debidamente desinfectados. Varias cepas de *Fusarium oxysporum* generan micotoxinas como nivalenol, fumosinas, ácido fusárico, furinas y zearalenona que participan en el proceso de desarrollo de la enfermedad (Damodaran et al., 2020; Siamak & Zheng, 2018; Viljoen et al., 2020). El banano ‘Gros Michel’ (genotipo AAA) en la década de 1950 fue devastado por la raza 1 del hongo ocasionando grandes pérdidas económicas, por la rápida expansión a nivel mundial de la enfermedad. Debido a la alta resistencia de las esporas de diseminación de *Fusarium* llamadas clamidosporas en el suelo se dio un rápido declive de los cultivares de banano susceptibles (R. C. Ploetz, 2015; Siamak & Zheng, 2018). Por otro lado, el cultivar ‘Cavendish’ (AAA) no es afectado por Foc raza 1 y 2 pero sí por una cepa subtropical de fusarium llamada raza 4 perteneciente al grupo de compatibilidad vegetativa 01213/16 (VCG 01213/16) o también mencionada como raza subtropical 4 de *Fusarium oxysporum* (STR4), actualmente es el hongo que mayor amenaza provoca al cultivo del banano, se ha reportado grandes pérdidas desde su primera aparición en 1990 en varios países del continente Asiático, Africanos y en Australia (Magdama et al., 2020; Viljoen et al., 2020). En Ecuador no existen reportes de la presencia de FocRT4 y el que predomina es el FocR1 perteneciente al VCG 0120 (Magdama et al., 2020). Por otro lado, se ha reportado la aparición de FocRT4 en los países vecinos como Colombia en el 2019 en el departamento de la Guajira afectando alrededor de 175 ha puestas en cuarentena, en Perú en el 2021 en el distrito Querecotillo en una finca bananera de 1 ha y además en Venezuela en los estados de Aragua, Carabobo y Cojedes en el 2023, por lo que se recomienda tomar medidas de prevención para evitar su ingreso a Ecuador (Acuña et al., 2022; F. A. García-Bastidas et al., 2020; Mejías Herrera et al., 2023). Por el momento no se conoce un control efectivo para esta enfermedad debido a su variabilidad patogénica y a su habilidad para subsistir independientemente de la presencia de su huésped (Damodaran et al., 2020; Siamak & Zheng, 2018)

2.3.2. *Pseudocercospora fijiensis*

La Sigatoka negra es una enfermedad provocada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*. Reduce la actividad fotosintética de la planta. Sus esporas se diseminan por el aire y se asientan en el área foliar, formando estructuras filamentosas o hifas que penetran por los estomas. Este proceso desencadena la formación de lesiones necróticas que coalescen, creando estrías y manchas irregulares en la superficie foliar. Si su control es tardío puede extenderse hasta alcanzar el 100% de la superficie de las hojas, resultando en el desarrollo de racimos prematuros y posteriormente la muerte de la planta. (Rodríguez-García et al., 2016; D. R. Jones, 2019). De acuerdo con la

FAO, esta enfermedad afecta anualmente la producción mundial en un 40 % debido al incremento constantes del costo de producción, por el aumento de los ciclos de aplicaciones de fungicidas para su control, representando alrededor de \$220 mil millones de dólares a la economía global (FAO, 2017; Kimunye et al., 2021). Existe una gran diversidad genética en poblaciones de *P. fijiensis* de acuerdo con su ubicación geográfica lo cual su agresividad o virulencia puede ser influenciada por múltiples factores, sobre todo en generar resistencia a varias moléculas de fungicidas lo que resulta un difícil manejo de la enfermedad o la elaboración de programas fitosanitarios efectivos (Chong et al., 2021; Manzo-Sánchez et al., 2019). Existen varios híbridos de banano que tienen resistencia a *P. fijiensis*, tales como Calcula 4 (AA) y Tuu Gia (AA) pero su fruto no es apetecible, por otro lado, la variedad que mayormente se cultiva es Williams (AAA) la cual es susceptible a sigatoka negra, de manera que en Ecuador es común realizar aplicaciones aéreas y manuales con fungicidas de diversos tipos, sobre todos en zonas de alta humedad (Quevedo G et al., 2018; Timm et al., 2016).

2.3.3. *Ralstonia solanacearum*

Una de las enfermedades bacterianas que provocan una baja en la producción del banano es la llamada Moko bacteriano el mismo que es causado por un complejo de cepas de *Ralstonia solanacearum*. Es una bacteria gram negativa que afecta a diferentes especies de plantas. El moko bacteriano provoca daños en el sistema de transporte de la planta y se manifiesta a través del amarillamiento de las hojas y la emisión de un exudado lechoso de color blanco en el tallo o pseudotallo de la planta (García et al., 2019). Se conoce que su principal medio de propagación es a través del suelo, agua e insectos que intervienen en la polinización, al igual que herramientas contaminadas (Safni et al., 2014). Por el momento, no se conoce un control efectivo para esta enfermedad, pero es posible el uso de agentes biocontroladores como *Bacillus spp.* para la disminución de su severidad en el campo (Hasinu et al., 2021). Esta enfermedad ha logrado disminuir la producción del banano en diferentes partes del mundo, como en el caso de Colombia donde se han reportado pérdidas del 100% de su producción en algunos sectores bananeros. (Belalcazar et al., 2004; Blomme et al., 2017). En Ecuador se reportó esta enfermedad por primera vez en cultivos de plátano en la provincia de Manabí del cantón El Carmen en el año 2013, aunque se han reportado daños en plantaciones bananeras no se ha logrado cuantificar las mermas generadas por esta enfermedad (Delgado et al., 2014; Saquicela Cruz et al., 2023). Por otro lado, también se ha notado la presencia de este patógeno por primera vez en arboles de eucaliptos en la provincia de Los Ríos (Álvarez Romero et al., 2021)

2.3.4. Virus del cogollo racimoso del banano (BBTV) y virus del rayado del banano (BSV)

Las enfermedades virales en plantaciones bananeras pueden decrecer su producción o la pérdida total del área cultivada si la detección del virus no se lo realiza a tiempo, debido a que no existe una medida de mitigación para estos patógenos, el virus del cogollo racimoso del banano (BBTV) es uno de los más devastadores del cultivo el cual provoca deformidades en la planta sobre todo en el área foliar induciendo que no se produzca frutos, se propaga a través de materiales vegetales contaminados y por el ataque de áfidos, se conoce que hasta el año 2021 no se han reportado incidencias de BBTV América. Por otro lado, el Virus del rayado del banano (BSV) también es considerado como una amenaza en la producción del banano, provoca daños en las hojas en forma de vetas amarillas, deformación del pseudotallo, ha sido reportado en países del continente Africano, una de las formas de prevenir enfermedades virales en banano es el uso de cultivares resistentes (R. A. C. Jones, 2021; Kumar et al., 2011; Martinez-Solórzano et al., 2023; Ouattara et al., 2023)

2.4. Efecto del control químico de patógenos sobre el cultivo del banano y la salud humana

Alrededor del 99% del banano de exportación provienen de un monocultivo con un manejo convencional, lo que implica el uso intensivo de pesticidas, provocando que en algunas ocasiones queden residuos en la fruta cosechada que pueden afectar a la salud consumidor (Hutter et al., 2021). De acuerdo con la Red de Acción de Pesticidas de Europa (PAN Europa) mencionan que enfermedades como cáncer, Parkinson, reacciones alérgicas, problemas reproductivos, respiratorios y dermatológicos son causa del manejo de plaguicidas en la agricultura, tal es el caso de herbicidas como el glifosato, que es usado ampliamente en prácticas para el control de malezas, y que afectan a enzimas de estrógenos en células humanas, por esta razón se relaciona con problemas de embarazos. Teniendo en cuenta esta información, se puede inferir que en Ecuador al menos 13,883.76 mujeres que participan en alguna actividad de la producción bananera podrían estar relacionadas con este problema de salud (MAG, 2022; Pesticide Action Network Europe (PAN Europe), 2005). En la actualidad varios ingredientes activos de uso agrícola han sido prohibidos en la Unión Europea (UE), con una proyección en aumento, lo que restringe cada vez más el uso de pesticidas para el control de los patógenos (Pesticide Action Network Europe (PAN Europe), 2020). En Ecuador se conoce sobre el caso del paracuat, el cual fue prohibido en el 2018 como precaución para asegurar la seguridad sanitaria (Hutter et al., 2021).

Un problema significativo en el uso de pesticidas es la resistencia que los patógenos puedan adquirir. Esta resistencia surge debido al aumento del uso de fungicida en un

intento de conseguir resultados positivos en el cultivo. Esto representa una amenaza para quienes aplican productos de forma directa en el campo sin ningún equipo de protección, ya que están expuestos al producto químico. Por otro lado, muchas aplicaciones de fungicidas en el cultivo de banano se lo realiza vía aérea, generando contaminación por deriva del aire, suelo y ambiente en general de los trabajadores de las haciendas y las comunidades aledañas al cultivo (Wesseling et al., s. f.). Esto también genera el empobrecimiento del suelo y su biota, por los daños que los pesticidas causan en los macros y micros organismos benéficos que se encuentran en el suelo y que por lo general ayudan a la nutrición de la planta. El alto uso de plaguicidas y fertilizantes edáficos en el manejo convencional del banano degradan la materia orgánica y cambian el pH en el suelo dificultando la estabilidad y supervivencia de las comunidades de estos organismos. (Gutiérrez & Romero Zarate, 2010; Jaramillo Laverde et al., 2019)

2.5. Mecanismo del ARN de interferencia (ARNi) y su uso potencial en la agricultura

El ARN de interferencia (ARNi) es un proceso biológico que actúa en el silenciamiento de genes que inducen la virulencia en los patógenos, este mecanismo sucede de forma natural en las plantas y/o células eucariotas como un método para la regulación de genes y de defensa contra los virus (Hung & Slotkin, 2021). El proceso de silenciamiento comienza cuando se introduce un ARNdc al hospedero y es cortado de forma selectiva por una enzima llamada Dicer, convirtiéndolos en pequeños fragmentos de 21 – 25 nucleótidos de longitud, llamados ARN de interferencias cortos (siRNA), luego la cadena de antisentido guía a una proteína llamada argonauta (AGO) que reconoce los extremos de los siARN y corta los sitios donde se junta el siRNA y el ARNm, formando un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) siendo capaz de intervenir en el proceso de la traducción, degradando por completo el ARN mensajero (ARNm) o eliminando por la expresión de los genes objetivos (Borges & Martienssen, 2015b; Noriega et al., 2016). Cuando se aplica el ARNdc debido a que las células de cada tipo de organismo poseen autonomía celular, la molécula puede ser absorbida y generar el silenciamiento dependiendo su mecanismo, este proceso puede variar de acuerdo al individuo, y al ser un proceso en la post transcripción donde las moléculas aplicadas y cortadas actúen de forma directa sobre el ARNm en el citoplasma celular (Sarkies & Miska, 2014). Esta técnica ha sido usada en mamíferos para tratar enfermedades infecciosas y autoinmunes mediante terapias con una alta especificidad (C. X. Li et al., 2006), además en la agricultura se ha comenzado a utilizar en investigaciones sobre el control de plagas como insectos, hongos, nemátodos, y para el estudio de genomas mediante el silenciamiento genético (Noriega et al., 2016).

Una de los motivos porque esta técnica ha comenzado a trascender en la agricultura es debido al uso sustentable y a su alta eficiencia en el control de plagas y patógenos, evitando o disminuyendo el uso de agroquímicos, impidiendo que se generen resistencia a la molécula aplicada (Mezzetti et al., 2020). Muchos investigadores optan por el estudio de las nuevas herramientas de ARNi mediante dos métodos: i. Silenciamiento genético inducido por el huésped (HIGS por su siglas en inglés), donde la propia planta es capaz de producir el ARNdc o siRNA mediante modificaciones genéticas realizadas de acuerdo al patógeno o plaga que se pretende controlar (Koch & Wassenegger, 2021; Zand Karimi & Innes, 2022). ii. Silenciamiento genético inducido por rocío (SIGS por su siglas en inglés), donde se debe sintetizar o generar la molécula de ARNdc in vitro y luego aplicarlo a la plantas para que el patógeno o plaga la tome mediante ingestión, esta metodología no es considerada como un OGM o transgénico, por lo que podría ser aplicada en cualquier país que tengan regulaciones para OGM (Qiao et al., 2021; Wang & Jin, 2017).

En la agricultura se ha utilizado esta técnica en: el control de nemátodos del trigo y una gran variedad de artrópodos como *Diabrotica virgifera* mediante aplicaciones de ARNi en la planta, para que sea absorbida y luego tomado por el parásito o insecto, reduciendo su fecundidad y provocando su muerte (Blyuss et al., 2019; Zotti et al., 2018). El control de hongos del género *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* que producen micotoxinas que reducen principalmente el valor y calidad de las cosechas (Koch et al., 2016; Majumdar et al., 2017b). y en otros cultivos como tabaco, maíz, uva, orquídeas, tomate, sandía, zapallo, entre otros (Das & Sherif, 2020)

2.6. Manejo de las enfermedades de banano mediante ARNi

Se conoce que para el manejo convencional del cultivo del banano es indispensable el uso de agroquímicos que provocan una resistencia a los patógenos, que además es dañino para la salud humana y el medio ambiente. Por lo tanto, se ha optado realizar investigaciones para el control de patógenos mediante el uso de herramientas con ARNi, esto se aplica a enfermedades virales como el virus del cogollo racimoso del banano (BBTV) mediante el control de áfidos y al BBTV silenciando el gen *ihp rep* que codifica a la proteína BBTV-DNA1 mediante infección con *Agrobacterium spp.* en una expresión transitoria (Elayabalan et al., 2017). Por otro lado, se han evidenciado estudios para el control del picudo negro del banano *Cosmopolites sordidus*, mediante ensayos de inhibición del insecto en el cual se suministraba ARNdc que inhiben los genes *rps13*, *snF7*, *mad1*, *vha-a*, *vha-d* y *lgl* del insecto, suministrándolo a través de su dieta diaria en medios de cultivos seleccionados por 45 días, logrando una inhibición del 100% (Mwaka et al., 2022). Otros estudios muestran la eficiencia de control de nemátodos (Joseph, 2013) y *Fusarium oxysporum* RT4, generando resistencia en la planta hospedera a través de la herramienta de ARNi - HIGS (Dou

et al., 2020) . Existe una desventaja en la aplicación de esta tecnología debido a que muchos estudios se centran en generar plantas transgénicas, lo cual no es aplicable en todos los países productores de banano como Ecuador (Pacheco Coello et al., 2017). A pesar de tener limitantes en el uso de variedades transgénicas, el estudio desarrollado por Mumbanza en la inhibición de patógenos como *Fusarium oxysporum* y *Pseudocercospora fijiensis* de muestra que es una metodología aplicable para el uso mediante la herramienta – SIGS (Mumbanza et al., 2013a)

2.7. Nanopartículas para la entrega del ARNdc en la protección de los cultivos

El ARNdc es un tipo de ácido nucleico el cual puede ser degradados por endonucleasas que suelen encontrarse en el ambiente, por lo que es posible que su efectividad pueda disminuir al ser aplicado mediante rocío (SIGS), por lo tanto, se han probados diferentes tipos de nanopartículas de diferentes materiales que brinde una adecuada protección del ARNdc y a su vez no disminuya su capacidad de silenciamiento de los genes objetivos. Entre los diferentes tipos de nanopartículas de materiales biodegradables que se han estudiado encontramos; quitosano, liposomas, nanogeles, poli-L-lisita, poli-L-arginina, hidróxido dobles laminares de Mg-Al (Deka et al., 2010; Lichtenberg et al., 2020; X. Zhang et al., 2010), entre otros. El tipo de material más eficiente puede depender del hospedero al cual se lo destina a aplicar, considerando la baja toxicidad, el tamaño y estructura de las nanopartículas, además que sean compatible con la carga negativa del ácido nucleico (Hernández-Soto & Chacón-Cerdas, 2021). Se ha demostrado que las nanopartículas de hidróxido dobles laminares de Mg-AL son de los mejores materiales utilizados para la entrega del ARNdc, debido a su fácil degradación y compatibilidad (Chen et al., 2013; Dong et al., 2014; Lichtenberg et al., 2020). Las nanopartículas de LDH han sido probados en la entrega de ARNi para la inhibición de *Fusarium spp*, virus e insectos, demostrando una alta eficiencia en la protección de las moléculas de ARNdc sin delimitar su capacidad de inhibición (Jain et al., 2022; Mitter et al., 2017; Mosa & Youssef, 2021).

CAPÍTULO 3

3. Metodología

3.1. Ubicación del estudio

Los ensayos a nivel *in vitro* para la evaluación de los genes objetivos para medir la capacidad de inhibición sobre patógeno y la evaluación de la translocación de la molécula en las plántulas de banano, fueron desarrollados en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), perteneciente a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), ubicado en el campus Gustavo Galindo de la ciudad Guayaquil – Guayas – Ecuador. Se trabajó en el laboratorio de Biología Molecular y en el invernadero del CIBE – ESPOL. Por otro lado, la síntesis de nanopartículas de hidróxido dobles laminares de Mg-AL se desarrolló en el laboratorio del Centro de Estudios Ambientales de la Universidad de Cuenca (UC) situada en el campus Balzay – Cuenca - Azuay – Ecuador.

3.2. Obtención del inóculo

Todos los ensayos de inhibición fueron realizados con el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 del aislado “EC35-G-GM1”, recolectado en la provincia del Guayas, esta cepa pertenece a la colección del laboratorio de fitopatología del CIBE – ESPOL (Magdama et al., 2020). Notablemente existe una alta similitud en las secuencias de los genes objetivos utilizados entre FocR1 y FocRT4 (Anexo 3). El hongo fue sembrado y mantenido en cajas Petri con un medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA) (Ref: TM344, Difco, USA) a una temperatura de 28°C. En cada ocasión que se realizó un ensayo de inhibición se preparaba una suspensión de esporas fresco en medio Caldo de Dextrosa de Papa (PDB) (Ref: 254920, Difco, USA), con el fin de obtener esporas del hongo no germinados. Para la obtención de esporas se tomó 3 discos de 0.5 mm de diámetro de las cepas mantenidas en medio sólido, con la ayuda de un sacabocados, luego se lo transfirió a 50 ml del medio líquido PDB estéril y se lo mantuvo por 6 días a 28°C en la incubadora agitadora (Innova 40, New Brunswick, Alemania) a 150 RPM, posteriormente, la suspensión de esporas fue filtrada con la ayuda de un filtro estéril, el cual consistía en un recipiente de vidrio de boca ancha con 4 capas de gaza perfectamente ajustado con bandas elásticas, para eliminar las estructuras miceliales del hongo. Finalmente se tomó una alícuota de la suspensión de esporas filtrada para la estimación de la concentración con la ayuda de una cámara de Neubauer (Boeco, Alemania) y un contador manual, la concentración de espora se lo estimó de acuerdo a lo recomendado por (Bastidas, s. f.)

3.3. Caracterización molecular

3.3.1. Genes objetivos

En este estudio se consideraron los genes objetivos descritos en la tabla 1 para el silenciamiento mediante ARNi en el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* de la raza 1

Tabla 1. Descripción de los genes objetivos para el silenciamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1.

Gen Objetivo	Descripción	Referencia
<i>Beta tubulina (Focβ-tub)</i>	Formación de microtúbulos, intervienen en la división celular, transporte intracelular y respuesta a procesos fisiológicos.	(The Gene Ontology Consortium et al., 2023)
<i>C5 – Esterol desaturasa (FocERG3)</i>	Biosíntesis del ergosterol, vital importancia en la membrana celular de los hongos, en la resistencia y adaptación a diferentes ambientes.	(The Gene Ontology Consortium et al., 2023; Trigos, 2007)
<i>Quitina sintasa 1 (FocChs1)</i>	Biosíntesis de la quitina, crecimiento de las estructuras y células del hongo, regulación del gradiente osmótico celular y mecanismo de defensa.	(Lenardon et al., 2010; The Gene Ontology Consortium et al., 2023)
<i>adenilato ciclasa (FocAdcy)*</i>	Está relacionado con la transducción de señales mediante proteínas G, esencial para la comunicación celular y la regulación de los procesos metabólicos	(Broach, 1991; The Gene Ontology Consortium et al., 2023)

*El gen *adenilato ciclasa (FocAdcy)* fue utilizado como un control, de acuerdo a estudios realizados por (Mumbanza et al., 2013a).

3.3.2. Diseño de primers de los genes objetivos

Para determinar la secuencia de los primers de los genes de interés se consultó la secuencia completa de cada gen objetivo del organismo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1 en la base de datos del navegador en línea “Ensemblfungi” (Martín et al., 2023) (Anexo 2), luego se ingresó la secuencia en el programa bioinformático “Primer 3” para obtener la secuencia del par de primers (forward y reverse), luego se les añadió la secuencia del promotor del ARN polimerasa T7 (subrayado en cada cebador de la Tabla 2), con la finalidad de realizar la síntesis de ARNdc. Los primers fueron sintetizados por MacroGen (USA).

Tabla 2. Primers para obtención del ARN de doble cadena con respecto a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1

Gen objetivo		Secuencia
<i>Beta tubulina</i> (β - <i>tub</i>)	Forward 5' - 3'	<u>GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGACTT</u> GAGCCTGGTACCATG GA
	Reverse 5' - 3'	<u>GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGG</u> GAGCAAAGCCAACCATG AA
<i>C5 – Esterol</i> <i>desaturasa</i> (<i>ERG3</i>)	Forward 5' - 3'	<u>GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> GGATCTTTGGGCTTCTCG T
	Reverse 5' - 3'	<u>GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> AATCGGCCCTCTGACATCTT C
<i>Quitina</i> <i> sintetasa 1</i> (<i>Chs1</i>)	Forward 5' - 3'	<u>GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> GGACAAGCCTCTCGAGTC TT
	Reverse 5' - 3'	<u>GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAG</u> GCATGACGAAGGCCAAGT AG
<i>Adenilato</i> <i>ciclase (Adcy)</i>	Forward 5' - 3'	<u>GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAT</u> GCACGAAAATTTTGGTC ACATATTCGC
	Reverse 5' - 3'	<u>GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAC</u> CATAATTTTGCCCGAGG CGC

3.3.3. Extracción de ADN

Para la obtención del ADN total se tomó aproximadamente 10 mg de micelio de una colonia del aislado EC35-G-GM1 del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1 y fue colocado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, posteriormente se añadió 350 μ l del buffer de extracción que contenía 200mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA y 0.5% SDS, luego con la ayuda de un micropistilo se aplastó hasta que el tejido quede totalmente triturado, adicionalmente se añadió 150 μ l de 3M de acetato de potasio pH 5.2 y se mezcló realizando un vortex por 30 segundos, se continuó con los pasos descritos en el Anexo 1. El ADN fue resuspendido en 50 μ l de agua ultra pura estéril, cuantificado en el Nanodrop 2000 (Invitrogen, USA) y almacenado a -20°C hasta su uso.

3.3.4. PCR punto final

La PCR punto final se desarrolló con todos los genes descritos en la tabla 1 con la ayuda del equipo Veriti™ 96-well thermal cycler (Applied Biosystems, USA), cada reacción fue de un volumen final de 50 μ l que contenía 1X del GoTaq® 2X master mix (Cat.# M7123, Promega, USA), 0.25 μ M de cada cebador (forward y reverse), 3 μ l de ADN molde (30 ng/ μ l) y complementado con agua ultra pura estéril hasta alcanzar los 50 μ l. Las condiciones de la PCR fueron: una desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 45 s, seguido de una extensión final de 72°C por 10 min. Posteriormente se cargó 5 μ l del producto final de cada reacción de PCR para ser analizado mediante una electroforesis horizontal con un gel de agarosa al 1.5% y corrido por 30 min a 10 V/cm, luego el gel fue revelado con la ayuda del transiluminador GelDoc XR+ y el software Quantity One (BioRad, USA) (Figura 1).

3.3.5. Síntesis de ARNdc

La síntesis de ARNdc se desarrolló bajo las instrucciones del kit MEGAscript™ T7 (Ref. AM1334, Invitrogen, USA), se utilizó 5 μ l del producto amplificado por PCR con los primers que contenían la secuencia del promotor ARN polimerasa T7 (forward y reverse) como ADN molde para obtener ARNdc homólogos a los segmentos de genes seleccionados para el estudio. El ARNdc fue cuantificado en el equipo Nanodrop 2000 (Invitrogen, USA).

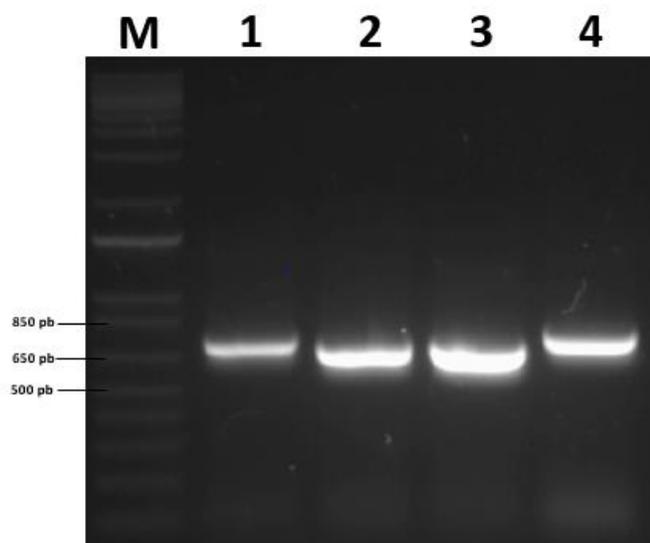


Figura 1. Amplificación por PCR de los genes objetivos del aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* de la raza 1. M: Marcador de peso molecular de 1kb; Línea 1: *adenilato ciclasa* (660 pb); Línea 2: *Quitina sintasa 1* (620 pb); Línea 3: *Beta tubulina* (614 pb); Línea 4: *C5 – Esterol desaturasa* (622 pb).

3.4. Bioensayo de inhibición con ARNdc sobre esporas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* de la raza 1

Las moléculas de ARNdc sintetizados a partir de los genes homólogos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* de la raza 1 fueron probados para determinar la inhibición de esporas mediante la reducción de colonias generadas de acuerdo a la metodología descrita por (Mumbanza et al., 2013a) con modificaciones. En resumen, se realizó una interacción FocR1/ARNdc a nivel in vitro. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml se colocó 10 μ l de la suspensión de esporas de FocR1 (5×10^5 esporas por ml) y 15 μ l del ARNdc o 15 μ l de agua en el caso del control, esta interacción se mantuvo a 28°C por 24 h aproximadamente, posteriormente se añadió 1.5 ml de agua ultra pura estéril y se mezcló suavemente, luego una alícuota de 100 μ l se polaqueó con la ayuda de una asa triangular estéril en un medio de cultivo de PDA (Ref: TM344, Difco, USA) a $\frac{1}{4}$ de su concentración normal, complementándolo con Bacto™ Agar (Ref: 214010, Difco, USA) [10 g PDA y 9 g de Agar L⁻¹]. Las placas fueron incubadas a 28°C en oscuridad por 36 h aproximadamente. Posteriormente se realizó un conteo de colonias, visualizándolas a través de la luz y marcando su posición.

3.4.1 Diseño experimental del bioensayo de inhibición

Se realizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) con tres réplicas biológicas en cada interacción de FocR1/ARNdc y 3 réplicas técnicas en el plaqueo por cada unidad biológica experimental. Se probaron diferentes concentraciones de ARNdc de acuerdo a lo descrito en la tabla 3. Los ensayos con los ARNdc de los genes objetivos fueron desarrollados en diferentes tiempos al igual que las pruebas con distintas concentraciones. Se realizó un control por cada ensayo realizado. Los genes objetivos fueron comparados mediante la prueba estadística “T-test” para establecer diferencias de inhibición.

Tabla 3. Descripción de los tratamientos aplicados en el bioensayo de inhibición

ARNdc	Dosis (mg/L)	Unidades biológicas	Unidades técnicas
Control	100		
<i>ARNdc-Focβ-tub</i>	250		
<i>ARNdc-FocERG3</i>	500	3	3
<i>ARNdc-FocChs1</i>	1000		
<i>ARNdc-FocAdcy</i>	1500		

3.4.2 Cálculo del porcentaje de inhibición del patógeno

El porcentaje de inhibición del ARNdc con los genes objetivos de FocR1 se calculó mediante la ecuación 1.

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de inhibición de colonias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \frac{\text{Tratamiento } (\Delta \text{ No. Colonias})}{\text{Control } (\Delta \text{ No. Colonias})} \times 100$$

3.4.3 Cálculo del IC50

Se realizó el cálculo del IC50 por cada ARNdc con respecto al gen objetivo evaluado mediante el Software estadístico Kyplot 6.0 versión libre (KyensLab Inc., Tokio, Japón).

3.5. Análisis de la translocación del ARNdc en plántulas de banano

Se evaluó el efecto de la aplicación de las moléculas de ARNdc sobre plántulas de banano de la variedad Williams (AAA) bajo condiciones de invernadero. El ensayo consistió en rociar con la ayuda de un atomizador manual una solución ARNdc [500 mg/L de *ARNdc-FocAdcy*, 1% de Tritón X (Sigma, USA), 1% de DMSO (Sigma, USA)] en el haz y envés de la hoja número 3 de la plántula de banano de aproximadamente 30 cm de altura. el control para este ensayo consistió en la aplicación de la misma solución añadiendo agua ultra pura en lugar del ARNdc. Posteriormente se recolectaron muestras en distintos puntos de tiempos y en diferentes tejidos de la planta con el fin de verificar la movilidad de la molécula de ARNdc a través de la técnica de Northern blot, tal como se lo detallada en la tabla 4. Las muestras fueron tomadas, etiquetadas e inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta procesarlas.

3.5.1. Diseño experimental del ensayo de translocación

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA) con dos réplicas biológicas por cada punto de tiempo evaluado, se recolectaron muestras a 1, 12, 24, y 48 horas post aplicación (hpa) de acuerdo con lo descrito en la tabla 4. En total se evaluaron 16 unidades muestrales debido a que se consideró un control (con dos réplicas biológicas) por cada toma de muestra.

Tabla 4. Descripción del ensayo de translocación de la molécula de ARNdc

Variedad	Aplicación	Tratamiento*	Punto de recolección	# de réplicas	Toma de muestras
Williams	Haz/Envés	Control (Agua + 1%DMSO + 1% Tritón x)	1 hora	2	Hoja # 2
					Hoja # 3
		12 horas	Hoja # 4		
			Pseudotallo		
		500 mg/LARNdc- <i>FocAdcy</i> (ARNdc+1%DMSO + 1%TRITON)	24 horas		Cormo
			48 horas		Raíz

*Se preparó una solución de DMSO y Tritón x como surfactante en la hoja

3.5.2. Obtención de la molécula del ARNdc para ensayo de translocación

Para la obtención del ARNdc de este ensayo inicialmente se realizó una extracción de ARN total de *FocR1* utilizando el método del Trizol[®] (Cat.15596-018, Invitrogen, USA), luego se obtuvo el ADN complementario (ADNc) con la ayuda del kit “Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit With dsDNase (Ref. K1642, Thermo Scientific, USA), posteriormente se realizó una RT-PCR para amplificar el gen *Adenilato ciclasa*, Los primers que se utilizaron contenían la secuencia del promotor T7 en cada extremo (Forward y reverse) y la secuencia del gen de interés. El ARNdc se lo obtuvo utilizando el kit completo “MEGA script T7 (Ref: AM1334, SIGMA, USA), y el producto de la RT-PCR de la reacción con el gen *Adenilato ciclasa* como molde.

3.5.3. Extracción de ARN total de tejidos de banano.

Las muestras de los tejidos almacenados a -80°C fueron retiradas e inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido para mantener la línea de frío, posteriormente se trituraron con la ayuda del molino MM400 (Retsch, Hann, Alemania), obteniéndose un polvo fino, luego se tomó 100 mg de cada tejido triturado para la extracción del ARN total, la cual se desarrolló utilizando la metodología descrita con el kit “SpectrumTM Plant Total RNA Kit” (Ref. STRN50-1KT, Sigma, St. Louis, USA). El

ARN total se cuantificó utilizando el Nanodrop 2000 (Invitrogen, USA) y almacenado a -80°C hasta su próximo uso.

3.5.4. Northern Blot

Se desarrolló la técnica de northern blot con el ARN total de todas las muestras de tejidos recolectados, como un método de alta sensibilidad para la detección de moléculas de ARNdc aplicado de forma foliar en la planta (De la Rosa & Reyes, 2019; Wiegard et al., 2021). El desarrollo de esta técnica se basó siguiendo las instrucciones de kit “Dig Northern Starter Kit” (Cat. No 12039672910, Roche, Suiza). Se realizó el etiquetado transcripcional de sondas de ARN para ser detectada mediante el reactivo digoxigenina-11-UTP propio del kit, para este propósito se utilizó $4\ \mu\text{l}$ del producto de la RT-PCR desarrollada anteriormente con el gen *Adenilato ciclasa*. Una vez generada la sonda para detectar las moléculas de *FocAdcyARNdc* se estimó su eficiencia del etiquetado realizando diluciones de acuerdo a lo descrito por el kit (Figura 2). Posteriormente se continuó con la metodología y se finalizó con la detección inmunológica mediante luminiscencia con la ayuda del equipo Stella 3200 (Raytest, Alemania) con 20 min de exposición en condiciones de oscuridad de acuerdo a las condiciones del kit. La imagen resultante se la analizó con el software “AIDA Image Analyzer” (Raytest, Alemania).

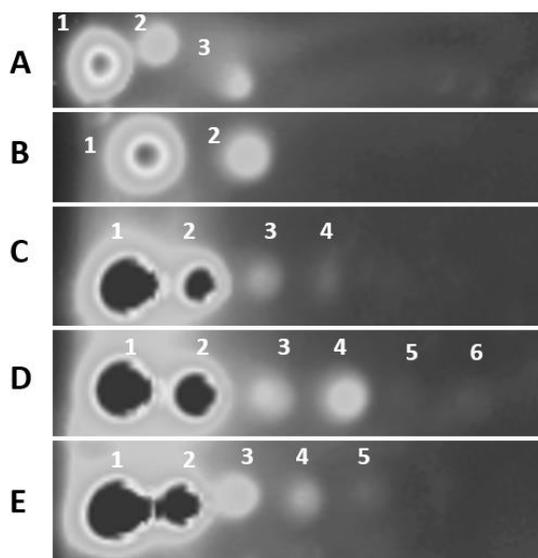


Figura 2. Determinación de la eficiencia de la sonda de ARN. A al E corresponden a diferentes reacciones de la generación de sondas con producto de la RT-PCR de *FocAdcy*. Los números indican la capacidad de detección mediante el digoxigenina-11-UTP de acuerdo con la dilución del ARN.

Tabla 5. Estimación de la concentración de ARN mediante dilución con respecto a la sonda D

Punto	Dilución	Conc. (ng/ μ l)
1	1	2140
2	1:10	214
3	1:100	2.14
4	1:3.3	0.65 \equiv 650 pg/ μ l
5	1:10	0.065 \equiv 65 pg/ μ l
6	1:10	0.0065 \equiv 6.5 pg/ μ l

La sonda D se seleccionó para la detección del *FocAdcyARNdc*, ya que demostró ser la más eficiente y sensible en este proceso.

3.6. Síntesis de nanopartículas LDH e intercalación con el ARNdc

3.6.1 Síntesis de nanopartículas LDH

Se desarrolló la síntesis de hidróxido dobles en capas de MgAl de acuerdo con la metodología de (Dong et al., 2014), en resumen, se preparó una solución de 10 ml de metanol (Cat. No. 3016-16, Mallinckrodt, USA) y nitratos de Mg-Al [6 mmol de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (Ref. 63084, Sigma, USA) y 2 mmol de $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ (Ref. 237973, Sigma, USA)] y por un goteo controlado se añadió a 40 ml de la solución de metanol con NaOH (Ref. 221465, Sigma, USA) [16 mmol], mezclándose con la ayuda de un agitador magnético por 30 min a 350 RPM. Posteriormente se recolectó el precipitado luego de una centrifugación por 5 min a 3000 RPM. El precipitado fue nuevamente resuspendido en 40 ml de metanol y transferido a un reactor con recipiente de teflón para síntesis hidrotermal, el cual fue sometido a 100°C por 4 horas y luego dejando enfriar a temperatura ambiente. Seguidamente, se recolectó el precipitado bajo las mismas condiciones anteriores y se realizó dos lavados con agua desionizada, luego se recolectó el precipitado y se dispersó en 40 ml de agua desionizada y se mantuvo entre 16 – 20 h a 70°C para secar y obtener cristales de nanoarcillas LDH. Posteriormente se realizó la caracterización de las nanopartículas LDH mediante un análisis en microscopio electrónico de transmisión.

3.6.2 Intercalación Nanopartículas/ARNdc

Se siguieron las recomendaciones de intercalado de ARNdc/LDH de (Mitter et al., 2017) y (Chen et al., 2013). Se mezcló diferentes ratios de la masa de *ARNdc-Foc β -tub* y nanopartículas LDH previamente suspendidos en 9% de PVP peso molecular 40000 (PVP-40, Sigma, USA). Se tomó 500 ng *ARNdc-Foc β -tub* en LDH con relaciones de 1:5, 1:7, 1:9, 1:10, 1:15 y 1:20 (p/p) en un volumen final de 10 μ l, luego se puso en incubación a 37°C por 1 hora en agitación, finalmente se agregó el buffer de carga (1x) previo a cargarla en un gel de agarosa de 1.5% que se corrió en una electroforesis a 10 V/cm por 30 min. Finalmente se analizó el gel en un transiluminador con luz UV para poder visualizar el resultado del intercalado.

CAPÍTULO 4

4. Resultado y discusión

4.1. Inhibición de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1

Se evaluó la capacidad inhibitoria de los ARNdc hacia los genes *Foc β -tub*, *FocERG3*, *FocChs1*, además del gen *FocAdcy*, utilizado como un control positivo, revelando la evolución de la inhibición a medida que se aumentaba la concentración en cada ARNdc, exceptuando a *ARNdc-FocERG3* ya que, durante las pruebas con dosis en el rango de 100 a 500 mg/L, no se evidenció un aumento en el porcentaje de inhibición a medida que se incrementaba la dosis. A partir de los 1000 mg/L se observó un aumento significativo en la inhibición de todos los ARNdc de los genes objetivos evaluados y observándose que en *ARNdc-FocChs1* y *ARNdc-FocAdcy* se alcanzó aproximadamente el 100% de la inhibición del crecimiento de las esporas. Por otro lado, *ARNdc-Foc β -tub* y *ARNdc-FocERG3* a la concentración de 1000 mg/L se logró obtener una inhibición media de 70.64 % y 81.3 % respectivamente, pero no fueron significativamente diferente con la dosis a 1500 mg/L (75.88% y 80.17 %) (Figura 3 al 5).

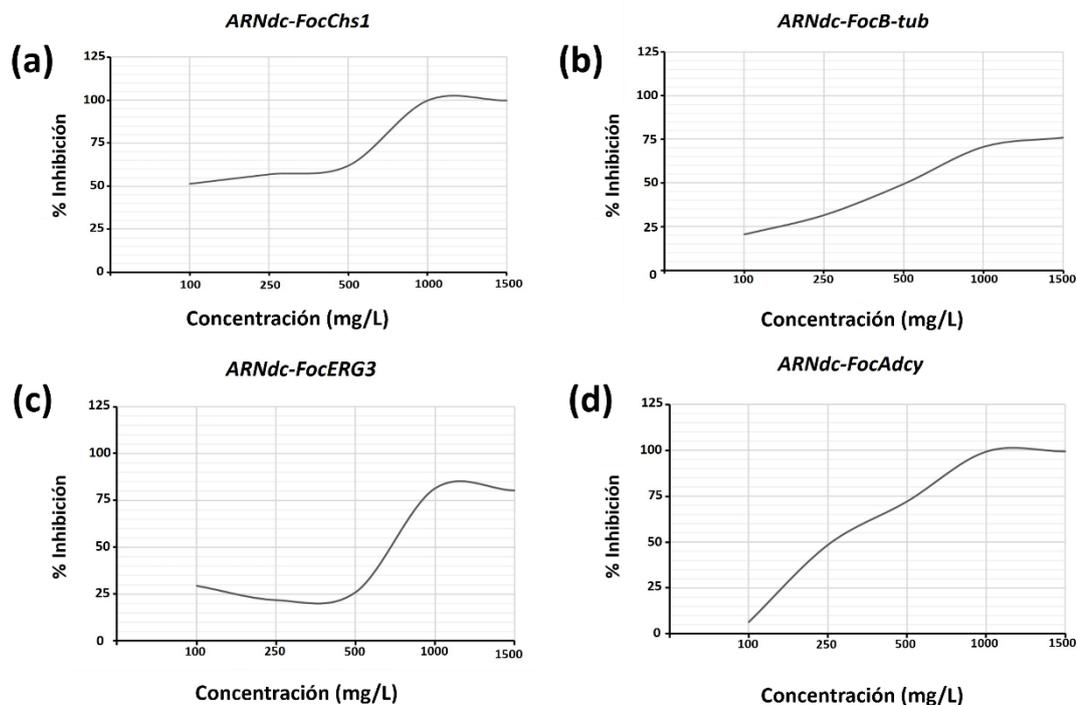


Figura 3. Curva de inhibición de los ARNdc a concentraciones de 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L, 1000 mg/L y 1500 mg/L sobre esporas del aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1. **(a)** Curva de inhibición de *ARNdc-FocChs1*. **(b)** Curva de inhibición de *ARNdc-FocB-tub*. **(c)** Curva de inhibición de *ARNdc-FocERG3*. **(d)** Curva de inhibición de *ARNdc-FocAdcy*.

El comportamiento de la inhibición de cada ARNdc se analiza de forma independiente, debido a la funcionalidad que posee cada gen en el organismo del hospedero, por otro lado, es factible apagar simultáneamente varios genes esenciales del organismo mediante la utilización de la herramienta de ARN de interferencia, permitiendo así aprovechar su máximo potencial (Hood, 2004).

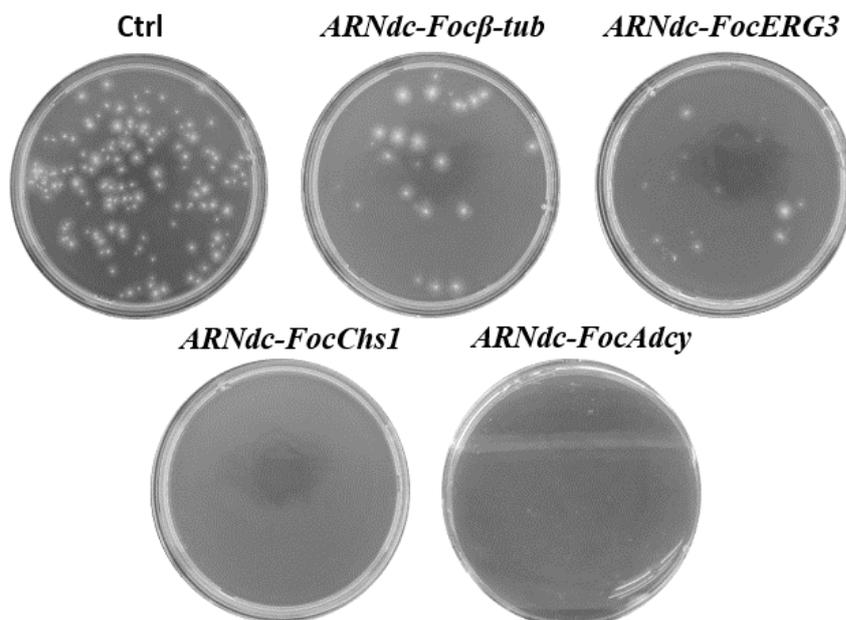


Figura 4. Inhibición de ARNdc a 1000 mg/L sobre el aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1. con ARNdc-FocChs1, ARNdc-FocB-tub, ARNdc-FocERG3 y ARNdc-FocAdcy.

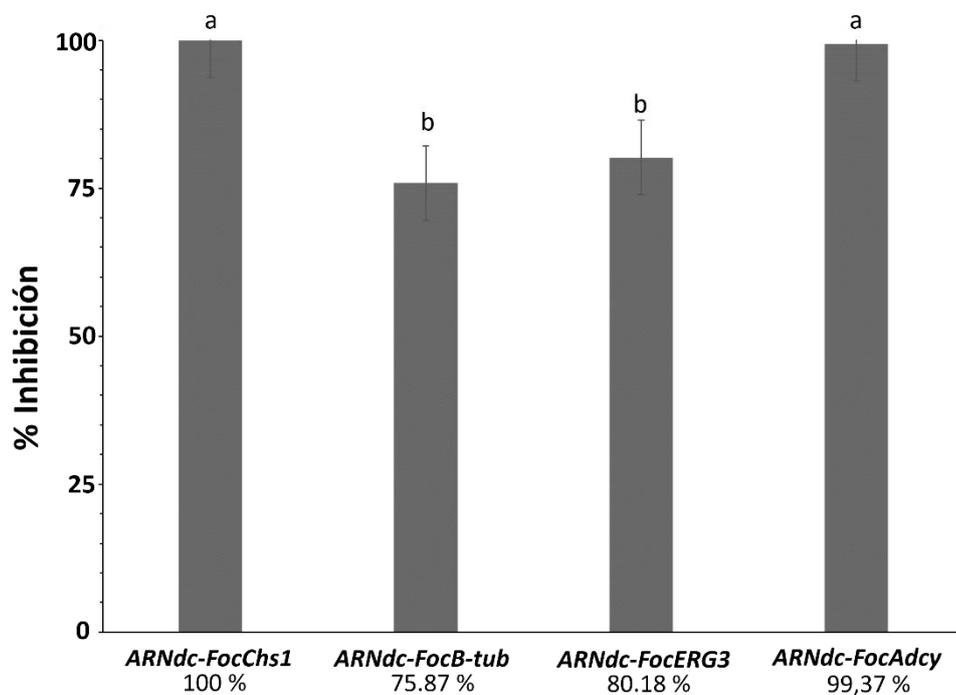


Figura 5. Gráfico de barras de la inhibición de esporas con *ARNdc-FocChs1*, *ARNdc-FocB-tub*, *ARNdc-FocERG3* y *ARNdc-FocAdcy* a 1500 mg/L sobre esporas del aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1. Las barras representan el error estándar. Las letras iguales sobre las barras no son significativamente diferentes a $p > 0.05$.

La elección del ARNdc de *FocAdcy* como control para la inhibición de las esporas de FocR1 se fundamentó en investigaciones anteriores, como el estudio realizado por Mumbanza et al. (2013). Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio presentan diferencias significativas respecto a los descritos por Mumbanza, donde se reportó un porcentaje de inhibición del 93% con una concentración de ARNdc de 0.6 mg/L en 25 ul de la interacción de esporas/ARNdc, una cifra considerablemente menor que la observada en nuestra investigación. Por otro lado, de acuerdo con (Fei et al., 2018) donde se enfocaron en la inhibición de 4 genes objetivos mediante ARNi para detener la virulencia y crecimiento de esporas de *Fusarium oxysporum*. que afecta a *Arabidopsis thaliana*, identificaron que 3 de ellos inhibió entre 100 a 153 veces con respecto a su control, utilizando 2.5 µg de ARNdc a una concentración de 100 mg/L, e indicando que el silenciamiento que obtuvieron podría ser mayor a la reportada por Mumbanza et al. 2013. Se debe considerar que las cepas utilizadas en los estudios mencionados son distintas procedencias a los que hemos utilizado, lo que podría explicar la variabilidad en cuanto a los resultados.

4.2. Comparación de los niveles del IC₅₀

Según el cálculo del IC₅₀ con *ARNdc-FocChs1*, *ARNdc-FocAdcy*, *ARNdc-FocB-tub* y *ARNdc-FocERG3*, se observó que las concentraciones medias fueron de 156.84 mg/L, 243.91 mg/L, 536.70 mg/L, 635.59 mg/L, respectivamente. El análisis de comparación de medias de Fisher reveló la existencia de dos grupos homólogos estadísticamente diferentes, identificados como A para *ARNdc-FocChs1* y *ARNdc-FocAdcy*; B para *ARNdc-FocB-tub* y *ARNdc-FocERG3*. Estos resultados indican diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos, pero no dentro de los genes designados con la misma letra. Además, se observó que *ARNdc-FocChs1* exhibe la concentración inhibitoria del 50% más baja en la población estudiada, lo que demuestra su eficacia, siendo igual o ligeramente más eficiente al gen control *ARNdc-FocAdcy* (Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de diferencia menos significativa (LSD) de Fisher con el IC50 de los genes objetivos para la inhibición de EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de la raza 1

ARNdc	Media IC ₅₀ *	Grupos homólogos *	repeticiones
ARNdc-FocChs1	156.84	A	9
ARNdc-FocAdcy	243.91	A	9
ARNdc-FocB-tub	536.70	B	9
ARNdc-FocERG3	635.59	B	9

*Los datos son representados en mg/L.

**Letras iguales no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

A pesar de señalar diferencias entre los grupos homólogos, el diagrama de cajas nos muestra el comportamiento todas las observaciones del cálculo del IC50 realizadas con respecto a cada ARNdc, revelando mayor variabilidad con *ARNdc-Foc β -tub* y *ARNdc-FocERG3* que con los genes *ARNdc-FocChs1* y *ARNdc-FocAdcy* que presentan una inhibición alta y estable en el análisis (Figura 6).

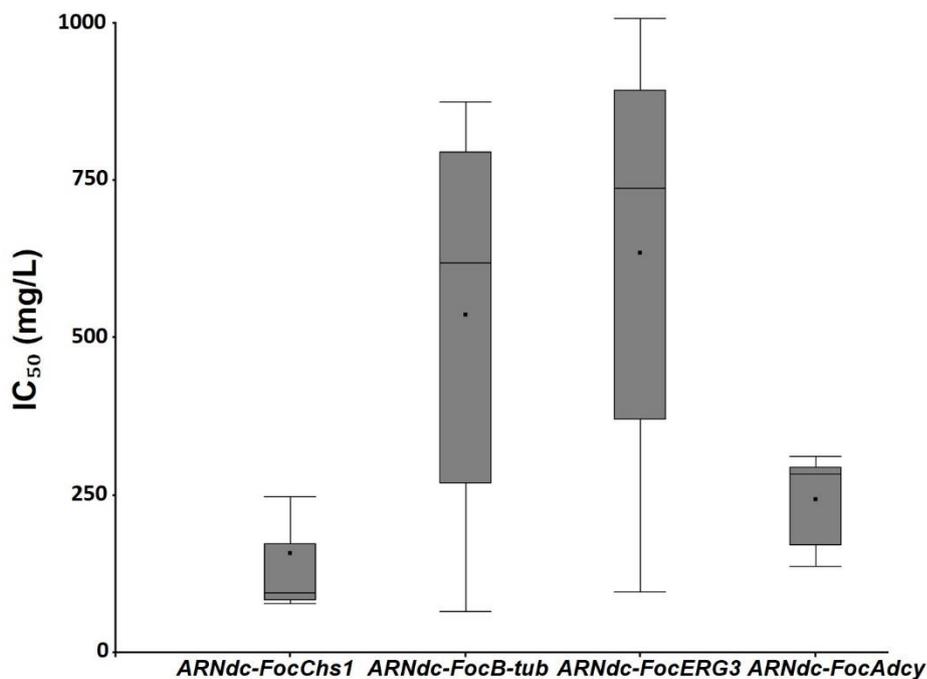


Figura 6. Diagrama de cajas de la Concentración Inhibitoria media (IC₅₀) en mg/L con ARNdc-FocChs1, ARNdc-FocAdcy, ARNdc-FocB-tub y ARNdc-FocERG3, sobre el aislado EC35-G-GM1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* de la raza 1. Se consideraron 9 observaciones por cada gen. Las barras representan el error estándar.

FocChs1 es uno de los genes que mayor inhibición ha presentado y su importancia vital en el organismo se debe a la biogénesis de la pared celular del hongo además de la integridad y su patogenicidad, ya que la quitina es de mucha importancia para la morfología celular, existiendo además varios genes asociados al proceso biosintético de la quitina (Ver Anexo 4), pero los mismo no presentan un mecanismo compensatorio, por lo tanto la capacidad inhibitoria evaluada en este estudio se debe a la eficiente degradación del ARNm de *FocChs1*, además del bloqueo en la formación de la quitina del hongo (Liu et al., 2017; Martín-Udíroz et al., 2004).

Por otro lado, *FocERG3* influye fuertemente en la virulencia y la formación de la biosíntesis del ergosterol en el hongo *FocR1*, además está involucrado en el proceso biosintético de la formación de lípidos al igual que ayuda a mantener la permeabilidad de la membrana celular (Han et al., 2023). Sin embargo, la participación de otros 25 genes relacionados en la vía metabólica de la producción del Ergosterol tales como el *ERG6*, *ERG2*, *ERG5*, *ERG4*, entre otros, participan en un mecanismo regulatorio que hace que la represión de uno de los genes no esenciales involucrados como el *ERG3* retrase el mecanismo metabólico de la producción del ergosterol en el organismo

(Bhattacharya et al., 2018; Jordá & Puig, 2020). Un estudio realizado en el análisis proteómico de la germinación de conidios de FocRT4 demostró que el ergosterol es de vital importancia, entre ellos la participación de los genes *ERG6*, *ERG11*, *ERG13* y *ERG25*, los cuales son candidatos para la inhibición temprana de FocRT4 para controlar el marchitamiento por *Fusarium oxysporum* en banano, siendo *ERG3* no mencionado en los resultados (Deng et al., 2015).

Foc β -tub está asociado con la formación de microtúbulos, los cuales crecen mediante la adición de Guanosina-5'-trifosfato (GTP) en el extremo de los microtúbulos. Se conocen al menos cuatro genes relacionados con esta función: $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - y $\beta 2$ -*tubulina* en la fase de crecimiento. La secuencia utilizada en este estudio se relaciona con $\beta 2$ -*tubulina*, que colocaliza con $\beta 1$ -*tubulina*, es decir, comparten una región específica. Estudios sobre el rol funcional de estos genes sugieren que $\beta 1$ -*tubulina* puede compensar la función de crecimiento en un mutante de $\Delta\beta 2$ -*tubulina*, indicando que $\beta 1$ - y $\beta 2$ -*tubulina* son intercambiables en la formación de microtúbulos y en el crecimiento vegetativo. Además, se demostró que la supresión de la expresión de $\alpha 2$ -, $\beta 1$ - y $\beta 2$ -*tubulina* no tiene un efecto evidente sobre la formación del citoesqueleto de microtúbulos, demostrando que $\alpha 1$ -*tubulina* es un gen esencial para este proceso. Este hallazgo puede explicar la inhibición parcial observada en nuestros ensayos, ya que de acuerdo con nuestros resultados se sabe que *Foc β -tub* interfiere parcialmente con FocR1 (Zhu et al., 2021).

Una explicación adicional para la limitada eficacia en la inhibición de esporas con *ARNdc-FocERG3* y *ARNdc-Foc β -tub* podría radicar en la posibilidad de que las secuencias de los ARNdc que fueron seleccionados y sintetizados para silenciar el ARNm de los genes objetivos de *FocERG3* y *Foc β -tub* no fueron lo suficientemente determinantes para ejercer un impacto significativo en su silenciamiento, dado que el tamaño de los fragmentos utilizados fue similar con los demás ARNdc ensayados.

4.3. Translocación de la molécula de ARNdc en tejidos de banano.

Se analizó la translocación de la molécula de *ARNdc-FocAdcy* en tejidos de plántulas de la variedad Williams (AAA) de banano, y se detectó la presencia del ARNdc en las muestras de las hojas #3 que fue donde se aplicó la molécula (Figura 7 y Anexo 5). En contraste, en los demás tejidos evaluados no se observó la presencia de la molécula dentro de los puntos de tiempo analizados. Este resultado nos indica que la molécula de *ARNdc-FocAdcy* no logró translocarse a otros tejidos de la planta.

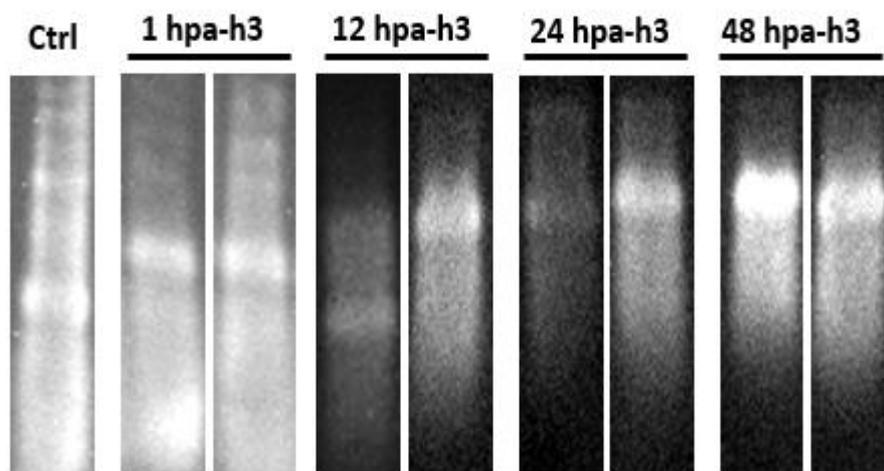


Figura 7. Detección de ARNdc por Northern blot en muestras de tejido de banano a 1, 12, 24 y 48 horas post aplicación, h3 corresponde a la hoja # 3 de la plántula de banano. Ctrl, corresponde al control del ARNdc (500 mg/L) con 1% Triton + 1% DMSO. Las muestras de cada punto del tiempo evaluado fueron procesadas de forma individual, a excepción de aquellas correspondientes a 24 y 48 horas post-aplicación (hpa), las cuales fueron analizadas conjuntamente en un único experimento de Northern blot.

Hasta el momento, existe muy poca información sobre la toma y translocación de ARNdc en plantas de banano, sin embargo, estudios en cebada, Arabidopsis, vid, entre otros se han realizado y se demuestra que el ARNi puede transportarse a través de floema hacia otros tejidos, inhibiendo el patógeno objetivo que afecta a estos cultivos (Biedenkopf et al., 2020; Nerva et al., 2020) (Numata et al., 2014) .

Una de las posibles causas de no detectar translocación del ARNdc en la planta de banano puede deberse a las condiciones de invernadero y características de la hoja de banano, ya que mantienen un recubrimiento ceroso que obstruye la libre entrada de la solución de ARNdc a través de las estomas y a pesar de que la solución contiene un surfactante al momento de aplicar mediante un rocío se puede perder una cantidad de ARNdc en el ambiente. Por otro lado, es posible que se requiera un mayor tiempo de evaluación para detectar la translocación ya que la cantidad de la molécula se puede reducir en otros tejidos.

Sin embargo, los resultados demuestran que el ARNdc se mantiene estable en condiciones de invernadero, al menos durante las 48 horas de evaluación en el sitio de aplicación. La detección de la molécula de *ARNdc-FocAdcy* en las hojas donde se aplicó la solución mediante el northern blot realizado, reflejó que el ARNdc en todos

los puntos de tiempo evaluados a pesar de haber estado expuestos a factores como polvo, humedad, y cambios de temperaturas, se encontró igual de íntegro que el control. Inclusive se apreció una mayor intensidad de la banda a las 48 hpa.

4.4. Optimización del ratio de intercalación de ARNdc-Foc β -tub – nanopartículas LDH

Se logró optimizar el ratio de intercalación del *ARNdc-Foc β -tub* y las nanopartículas de hidróxido dobles en capas de MgAl (LDH) a una relación del ratio de sus masas de 1:15. El resultado de la electroforesis con gel de agarosa evidenció que a medida que aumentaba la cantidad de LDH el ARNdc permanecía en el pocillo de carga, evidenciando así la capacidad de la intercalación de acuerdo con la cantidad de nanopartícula añadida (Figura 8).

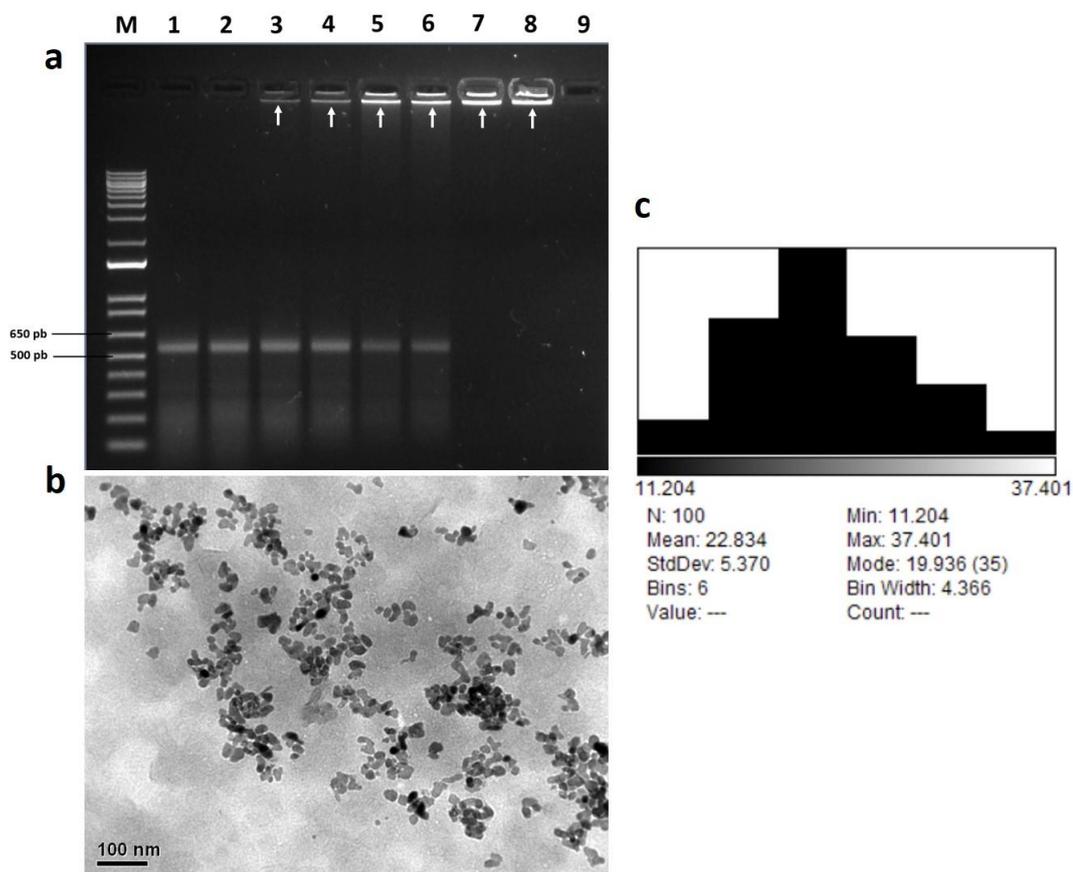


Figura 8. Intercalación del ARNdc en nanopartículas LDH y caracterización LDH. **a**, Intercalación del ARNdc-Foc β -tub y nanopartículas de hidróxido dobles en capas de MgAl (LDH) a ratios de la masa de 1:5, 1:7, 1:9, 1:10, 1:15 y 1:20 (p/p), correspondientes a las líneas 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente. M: Marcador de peso molecular de 1kb. Línea 1 ARNdc, Línea 2 ARNdc/PVP. Línea 9 LDH. El ARNdc al intercalarse con LDH no migra durante la electroforesis y puede observarse la fluorescencia en el pocillo (como lo indican las flechas). La intercalación completa logró realizarse en un ratio en relación a la masa ARNdc-LDH de 1:15 (Línea 7). **b**, imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las nanopartículas LDH. **c**, Distribución del tamaño de las nanopartículas LDH.

El tamaño de la molécula de ARNdc que se intercaló fue de 614 pb con una cantidad de 500 ng y el tamaño de las nanopartículas LDH fue de un promedio de 22.8 nm. Se logró una intercalación con un ratio de 1:15 (en la relación del ratio de sus masas), estudios similares como el de Mitter et al., (2017) lograron obtener una intercalación completa a una relación de 1:4, con un ARNdc sintetizado de 500 pb, a pesar de ser un amplicón del ARNdc con 114 pb menos al de nuestro estudio, la relación que obtuvieron es mucho más baja, esto se debe a la estructura, tamaño y características de las nanopartícula sintetizadas, donde el tamaño promedio fue de 45 nm y una morfología hexagonal. Por otro lado, El estudio de Molesini et al., (2022) demostró una intercalación de 1:50 del ratio de sus masas con un ARNdc de 729 pb, siendo las nanopartículas de un tamaño promedio de 26.2 nm. Estos datos nos pueden indicar que la eficiencia de la intercalación depende de la eficiencia de la síntesis de las nanopartículas LDH y el tamaño de la molécula de ARNdc (pb).

CAPÍTULO 5

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Los ensayos in vitro demostraron la capacidad inhibitoria de los ARNdc en estudio, evaluando su efecto sobre esporas de *FocR1* con 5 dosis. Se determinó el IC₅₀ de cada gen, resultando que *ARNdc-FocChs1* (IC₅₀ 156.84 mg/L) demostró ser más eficiente que *ARNdc-FocB-tub* (536.70 mg/L) y *ARNdc-FocERG3* (635.59 mg/L) al presentar el IC₅₀ más bajo y la inhibición del 100% de las esporas a una concentración de 1000 mg/L. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre *ARNdc-FocChs1* y *ARNdc-FocAdcy* (IC₅₀ 243.91 mg/L) utilizado como un control de la inhibición de esporas, lo cual demuestra que pueden ser considerados para inhibir la virulencia de *FocR1* en condiciones de campo o invernadero.

Se aplicó el *ARNdc-FocAdcy* en la hoja 3 de plántulas de banano de la variedad williams y se evaluó la translocación hacia los tejidos de hoja (hoja 2 y 4), pseudotallo, Cormoo y raíz consideraron los puntos de evaluación de 1, 12, 24 y 48 horas post aplicación (hpa) en condiciones de invernadero, de acuerdo con los resultados de este ensayo se encontró que el ARNdc no logró translocarse en los tiempos evaluados a los demás tejidos pero permaneció estable en lugar donde se aplicó, esto nos indica que la molécula de ARNdc podría actuar como un biopesticida de contacto.

Se estableció el ratio de intercalación entre las nanopartículas de LDH y el ARNdc a una relación del ratio de sus masas de 1:15, lo cual se podría comenzar estudios para determinar el grado de la degradación de las nanopartículas y determinar la liberación del ARNdc.

5.2. Recomendaciones

Los ensayos de inhibición se realizaron con los ARNdc sintetizados de un kit comercial, lo que resultaría muy caro al momento de probar el mecanismo de ARNi en invernadero o en campo, debido a que se requeriría de mucho más material. Por esta razón se recomienda estandarizar una metodología de obtención de ARNdc con bacterias. Por otro lado, se debe ajustar el método de cuantificación de ARNdc, para obtener concentraciones más precisas de inhibición. En relación con la translocación, se recomienda prolongar el periodo de evaluación y realizar los análisis, al menos, 48 horas post aplicación de la molécula de ARNdc.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, R., Rouard, M., Leiva, A. M., Marques, C., Olortegui, J. A., Ureta, C., Cabrera-Pintado, R. M., Rojas, J. C., Lopez-Alvarez, D., Cenci, A., Cuellar, W. J., & Dita, M. (2022). First Report of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cupense* Tropical Race 4 Causing Fusarium Wilt in Cavendish Bananas in Peru. *Plant Disease*, *106*(8), 2268. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1951-PDN>
- Álvarez Romero, P. I., Grabowski Ocampos, C., Carpio, C., Toro, V. S., Ferreira e Ferreira, A. F. T. A., & Mizubuti, E. S. G. (2021). First Report of *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt of Eucalyptus in Ecuador. *Plant Disease*, *105*(1), 211. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2516-PDN>
- Banco Central del Ecuador. (2020). *Evolución de la Balanza Comercial Enero – Mayo 2020*.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *121*, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
- Bastidas, O. (s. f.). *Cell Counting with Neubauer Chamber, Basic Hemocytometer Usage*. celeromics. <http://www.celeromics.com>
- Belalcazar, S. C., Rosales, F. E., & Pocasangre, L. E. (2004). El Moko del banano y el plátano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. *Proceedings of the XVI International ACORBAT Meeting, September*, 16-35.
- Bhattacharya, S., Esquivel, B. D., & White, T. C. (2018). Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio*, *9*(4), 10.1128/mbio.01291-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01291-18>
- Biedenkopf, D., Will, T., Knauer, T., Jelonek, L., Furch, A. C. U., Busche, T., & Koch, A. (2020). Systemic spreading of exogenous applied RNA biopesticides in the crop plant *Hordeum vulgare*. *ExRNA*, *2*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s41544-020-00052-3>
- Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K. S., Pérez Vicente, L., Molina, A., Ocimati, W., Poussier, S., & Prior, P. (2017). Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Frontiers in Plant Science*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.01290>
- Blyuss, K. B., Fatehi, F., Tsygankova, V. A., Biliavska, L. O., Iutynska, G. O., Yemets, A. I., & Blume, Y. B. (2019). RNAi-based biocontrol of wheat nematodes using natural poly-component biostimulants. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 483.
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015a). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>

- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015b). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>
- Broach, J. R. (1991). RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Signal transduction in search of a pathway. *Trends in Genetics*, *7*(1), 28-33.
- Cagliari, D., Dias, N. P., Galdeano, D. M., dos Santos, E. Á., Smagghe, G., & Zotti, M. J. (2019). Management of Pest Insects and Plant Diseases by Non-Transformative RNAi. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01319>
- Chen, M., Cooper, H. M., Zhou, J. Z., Bartlett, P. F., & Xu, Z. P. (2013). Reduction in the size of layered double hydroxide nanoparticles enhances the efficiency of siRNA delivery. *Journal of Colloid and Interface Science*, *390*(1), 275-281. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.09.033>
- Chong, P., Essoh, J. N., Arango Isaza, R. E., Keizer, P., Stergiopoulos, I., Seidl, M. F., Guzman, M., Sandoval, J., Verweij, P. E., Scalliet, G., Sierotzski, H., de Lapeyre de Bellaire, L., Crous, P. W., Carlier, J., Cros, S., Meijer, H. J. G., Peralta, E. L., & Kema, G. H. J. (2021). A world-wide analysis of reduced sensitivity to DMI fungicides in the banana pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *Pest Management Science*, *77*(7), 3273-3288. <https://doi.org/10.1002/ps.6372>
- Chong, P., Vichou, A.-E., Schouten, H. J., Meijer, H. J. G., Isaza, R. E. A., & Kema, G. H. J. (2019). Pfcyp51 exclusively determines reduced sensitivity to 14 α -demethylase inhibitor fungicides in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *PLOS ONE*, *14*(10), e0223858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223858>
- CONSTITUCIÓN DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR, BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES, Registro Oficial No. 449 , 20 de Octubre 2008, Biodiversidad Artículo 401 (2008).
- Damodaran, T., Rajan, S., Muthukumar, M., Ram Gopal, Yadav, K., Kumar, S., Ahmad, I., Kumari, N., Mishra, V. K., & Jha, S. K. (2020). Biological Management of Banana Fusarium Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* Tropical Race 4 Using Antagonistic Fungal Isolate CSR-T-3 (*Trichoderma reesei*). *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.595845>
- Dang, T. V. T., Windelinckx, S., Henry, I. M., De Coninck, B., Cammue, B. P., Swennen, R., & Remy, S. (2014). Assessment of RNAi-induced silencing in banana (*Musa* spp.). *BMC Research Notes*, *7*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-655>
- Das, P. R., & Sherif, S. M. (2020). Application of Exogenous dsRNAs-induced RNAi in Agriculture: Challenges and Triumphs. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00946>
- De la Rosa, C., & Reyes, J. L. (2019). Northern Blot Analysis of microRNAs and Other Small RNAs in Plants. En S. de Folter (Ed.), *Plant MicroRNAs: Methods and Protocols* (pp. 121-129). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_9

- Deka, S. R., Quarta, A., Di Corato, R., Falqui, A., Manna, L., Cingolani, R., & Pellegrino, T. (2010). Acidic pH-responsive nanogels as smart cargo systems for the simultaneous loading and release of short oligonucleotides and magnetic nanoparticles. *Langmuir*, *26*(12), 10315-10324.
- Delgado, R., Morillo, E., Buitrón, J., Bustamante, A., & Sotomayor, I. (2014). First report of Moko disease caused by *Ralstonia solanacearum* race 2 in plantain (*Musa AAB*) in Ecuador. *New Disease Reports*, *30*(1), 23-23. <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.030.023>
- Deng, G.-M., Yang, Q.-S., He, W.-D., Li, C.-Y., Yang, J., Zuo, C.-W., Gao, J., Sheng, O., Lu, S.-Y., Zhang, S., & Yi, G.-J. (2015). Proteomic analysis of conidia germination in *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* tropical race 4 reveals new targets in ergosterol biosynthesis pathway for controlling Fusarium wilt of banana. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(17), 7189-7207. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6768-x>
- Diaz-Trujillo, C., Chong, P., Stergiopoulos, I., Cordovez, V., Guzman, M., Wit, P. J. G. M. D., Meijer, H. J. G., Scalliet, G., Sierotzki, H., Peralta, E. L., Isaza, R. E. A., & Kema, G. H. J. (2018). A new mechanism for reduced sensitivity to demethylation-inhibitor fungicides in the fungal banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. *Molecular Plant Pathology*, *19*(6), 1491-1503. <https://doi.org/10.1111/mpp.12637>
- Dong, H., Chen, M., Rahman, S., Parekh, H. S., Cooper, H. M., & Xu, Z. P. (2014). Engineering small MgAl-layered double hydroxide nanoparticles for enhanced gene delivery. *Applied clay science*, *100*, 66-75.
- Dou, T., Shao, X., Hu, C., Liu, S., Sheng, O., Bi, F., Deng, G., Ding, L., Li, C., Dong, T., Gao, H., He, W., Peng, X., Zhang, S., Huo, H., Yang, Q., & Yi, G. (2020). Host-induced gene silencing of Foc TR4 ERG6/11 genes exhibits superior resistance to Fusarium wilt of banana. *Plant Biotechnology Journal*, *18*(1), 11-13. <https://doi.org/10.1111/pbi.13204>
- Elayabalan, S., Subramaniam, S., & Selvarajan, R. (2017). *Construction of BBTv rep gene RNAi vector and evaluate the silencing mechanism through injection of Agrobacterium tumefaciens transient expression system in BBTv infected hill banana plants cv. Virupakshi (AAB)*.
- Evans, E., & Ballen, F. (2021). *Banana Market*. University of Florida (UF), Institute of Food and Agricultural Sciences. <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/FE901>
- FAO. (2023a). Banana facts and figures. *Markets and trade*. <https://www.fao.org/economic/est/est-commodities/oilcrops/bananas/bananafacts/en/>
- FAO. (2023b). *Banana Market review 2022*.
- FAO, F. (2017). AO (2017) The future of food and agriculture—trends and challenges. *The future of food and agriculture: trends and challenges*.
- FAOSTAT. (2021). *FAO*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>

- Fei, S., Constantin, M., Peters, J., Batley, J., Aitken, E., & Mitter, N. (2018). RNAi-based management for Fusarium wilt of banana. *International Symposia on Tropical and Temperate Horticulture-ISTTH2016 1205*, 717-720.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), Article 6669. <https://doi.org/10.1038/35888>
- García, R. O., Kerns, J. P., & Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Quick Diagnostic Guide. *Plant Health Progress*, *20*(1), 7-13. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-18-0015-DG>
- García-Bastidas, F. A., Quintero-Vargas, J. C., Ayala-Vasquez, M., Schermer, T., Seidl, M. F., Santos-Paiva, M., Noguera, A. M., Aguilera-Galvez, C., Wittenberg, A., Hofstede, R., Sørensen, A., & Kema, G. H. J. (2020). First Report of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Cavendish Bananas Caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Disease*, *104*(3), 994-994. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-19-1922-PDN>
- García-Bastidas, F., Ordóñez, N., Konkol, J., Al-Qasim, M., Naser, Z., Abdelwali, M., Salem, N., Waalwijk, C., Ploetz, R. C., & Kema, G. H. J. (2013). First Report of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* Tropical Race 4 Associated with Panama Disease of Banana outside Southeast Asia. *Plant Disease*, *98*(5), 694-694. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0954-PDN>
- Ghag, S. B., Shekhawat, U. K. S., & Ganapathi, T. R. (2014). Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against Fusarium wilt in banana. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(5), 541-553. <https://doi.org/10.1111/pbi.12158>
- Gonzabay, R. (2017). Cultivo del banano en el Ecuador. *Revista AFESE*, *58*(58), Article 58. <http://www.revistaafese.org/ojsAfese/index.php/afese/article/view/317>
- Guo, L., Han, L., Yang, L., Zeng, H., Fan, D., Zhu, Y., Feng, Y., Wang, G., Peng, C., Jiang, X., Zhou, D., Ni, P., Liang, C., Liu, L., Wang, J., Mao, C., Fang, X., Peng, M., & Huang, J. (2014). Genome and Transcriptome Analysis of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* Causing Banana Vascular Wilt Disease. *PLOS ONE*, *9*(4), e95543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095543>
- Gutiérrez, J. C., & Romero Zarate, M. F. (2010). *Prácticas de manejo y conservación de suelos en el cultivo de banano* (Comunicaciones AUGURA). SENA.
- Han, S., Sheng, B., Zhu, D., Chen, J., Cai, H., Zhang, S., & Guo, C. (2023). Role of FoERG3 in Ergosterol Biosynthesis by *Fusarium oxysporum* and the Associated Regulation by *Bacillus subtilis* HSY21. *Plant Disease*, *107*(5), 1565-1575. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1010-RE>
- Hasinu, J. V., Tuhumury, G. N. C., & Kesaulya, H. (2021). Potential of *Bacillus* spp as a biocontrol agent against *Ralstonia* bacterial wilt in bananas. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *883*(1), 012039. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/883/1/012039>

- Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A., & Neve, P. (2019). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, *94*(1), 135-155. <https://doi.org/10.1111/brv.12440>
- Hernández-Soto, A., & Chacón-Cerdas, R. (2021). RNAi Crop Protection Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(22), Article 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222212148>
- Hood, E. (2004). RNAi: What's all the noise about gene silencing? *Environmental Health Perspectives*, *112*(4), A224-A229.
- Hung, Y.-H., & Slotkin, R. K. (2021). The initiation of RNA interference (RNAi) in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *61*, 102014. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102014>
- Hutter, H.-P., Poteser, M., Lemmerer, K., Wallner, P., Kundi, M., Moshhammer, H., & Weitensfelder, L. (2021). Health Symptoms Related to Pesticide Use in Farmers and Laborers of Ecological and Conventional Banana Plantations in Ecuador. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijerph18031126>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC]. (2022). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuario Continua (ESPAC)—Banano: Boletín técnico*.
- Jain, R. G., Fletcher, S. J., Manzie, N., Robinson, K. E., Li, P., Lu, E., Brosnan, C. A., Xu, Z. P., & Mitter, N. (2022). Foliar application of clay-delivered RNA interference for whitefly control. *Nature Plants*, *8*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01152-8>
- Jaramillo Laverde, A., Valencia Montoya, J., Chavez Oliveros, L., Marina, B., Huberto, M., & Milena, R. (2019). *Practicas de Manejo Sostenible para el Cultivo de Platano*.
- Jones, D. (2000). *Diseases of Banana, Abaca and Enset*.
- Jones, D. R. (2019). Fungal diseases of the foliage. *Handbook of diseases of banana, abacá and enset*, 41-206. <https://doi.org/10.1079/9781780647197.0041>
- Jones, R. A. C. (2021). Global Plant Virus Disease Pandemics and Epidemics. *Plants*, *10*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/plants10020233>
- Jordá, T., & Puig, S. (2020). Regulation of Ergosterol Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes*, *11*(7), 795. <https://doi.org/10.3390/genes11070795>
- Joseph, S. (2013). *Analysis of RNAi strategies against migratory parasitic nematodes of banana*. Ghent University.
- Kimunye, J., Were, E., Swennen, R., Viljoen, A., & Mahuku, G. (2021). Sources of resistance to *Pseudocercospora fijiensis*, the cause of black Sigatoka in banana. *Plant Pathology*, *70*(7), 1651-1664. <https://doi.org/10.1111/ppa.13408>
- Koch, A., Biedenkopf, D., Furch, A., Weber, L., Rossbach, O., Abdellatef, E., Linicus, L., Johannsmeier, J., Jelonek, L., & Goesmann, A. (2016). An RNAi-based control of *Fusarium*

graminearum infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. *PLoS pathogens*, 12(10), e1005901.

Koch, A., & Wassenegger, M. (2021). Host-induced gene silencing – mechanisms and applications. *New Phytologist*, 231(1), 54-59. <https://doi.org/10.1111/nph.17364>

Kumar, P. L., Hanna, R., Alabi, O. J., Soko, M. M., Oben, T. T., Vangu, G. H. P., & Naidu, R. A. (2011). Banana bunchy top virus in sub-Saharan Africa: Investigations on virus distribution and diversity. *Virus Research*, 159(2), 171-182. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.021>

Lenardon, M. D., Munro, C. A., & Gow, N. A. (2010). Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, 13(4), 416-423. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>

Li, C. X., Parker, A., Menocal, E., Xiang, S., Borodyansky, L., & Fruehauf, J. H. (2006). Delivery of RNA Interference. *Cell Cycle*, 5(18), 2103-2109. <https://doi.org/10.4161/cc.5.18.3192>

Li, H., Guan, R., Guo, H., & Miao, X. (2015). New insights into an RNAi approach for plant defence against piercing-sucking and stem-borer insect pests. *Plant, Cell & Environment*, 38(11), 2277-2285. <https://doi.org/10.1111/pce.12546>

Lichtenberg, S. S., Laisney, J., Elhaj Baddar, Z., Tsyusko, O. V., Palli, S. R., Levard, C., Masion, A., & Unrine, J. M. (2020). Comparison of Nanomaterials for Delivery of Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(30), 7926-7934. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02840>

Liu, R., Xu, C., Zhang, Q., Wang, S., & Fang, W. (2017). Evolution of the chitin synthase gene family correlates with fungal morphogenesis and adaption to ecological niches. *Scientific Reports*, 7(1), 44527. <https://doi.org/10.1038/srep44527>

Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). Chapter Two—The Evolution of Fungicide Resistance. En S. Sariaslani & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 90, pp. 29-92). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>

MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). (2022). *Boletín Situacional Cultivo de Banano 2021*. [*Banana Crop Situation 2021 Bulletin*]. <https://fliphtml5.com/ijia/nbkc/basic>

Magdama, F., Monserrate-Maggi, L., Serrano, L., García Onofre, J., & Jiménez-Gasco, M. del M. (2020). Genetic Diversity of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense*, the Fusarium Wilt Pathogen of Banana, in Ecuador. *Plants*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/plants9091133>

Majumdar, R., Rajasekaran, K., & Cary, J. W. (2017a). RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00200>

- Majumdar, R., Rajasekaran, K., & Cary, J. W. (2017b). RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: Concepts and considerations. *Frontiers in plant science*, 8, 200.
- Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M., Islas-Flores, I., Martínez-Bolaños, L., Guzmán-González, S., Leopardi-Verde, C. L., & Canto-Canché, B. (2019). Genetic variability of *Pseudocercospora fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of banana (*Musa* spp.) in Mexico. *Plant Pathology*, 68(3), 513-522. <https://doi.org/10.1111/ppa.12965>
- Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Bignell, A., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Charkhchi, M., Cockburn, A., Da Rin Fiorretto, L., ... Flicek, P. (2023). Ensembl 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D933-D941. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac958>
- Martinez-Solórzano, G. E., Rey, J. C., Urias, C., Lescot, T., Roux, N., Salazar, J., & Rodríguez, Y. (2023). Banana bunchy top virus: Amenaza para las musáceas en América Latina y el Caribe. *Agronomía Mesoamericana*, 49577-49577. <https://doi.org/10.15517/am.v34i1.49577>
- Martín-Udíroz, M., Madrid, M. P., & Roncero, M. I. G. (2004). Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology*, 150(10), 3175-3187. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27236-0>
- Mejías Herrera, R., Hernández, Y., Magdama, F., Mostert, D., Bothma, S., Paredes Salgado, E. M., Terán, D., González, E., Angulo, R., Angel, L., Rodríguez, Y., Ortega, R., Viljoen, A., & Marys, E. E. (2023). First Report of Fusarium Wilt of Cavendish Bananas Caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* Tropical Race 4 in Venezuela. *Plant Disease*, 107(10), 3297. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-23-0781-PDN>
- Mezzetti, B., Smagghe, G., Arpaia, S., Christiaens, O., Dietz-Pfeilstetter, A., Jones, H., Kostov, K., Sabbadini, S., Opsahl-Sorteberg, H.-G., Ventura, V., Taning, C. N. T., & Sweet, J. (2020). RNAi: What is its position in agriculture? *Journal of Pest Science*, 93(4), 1125-1130. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01238-2>
- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E., Li, P., Jain, R. G., Taochy, C., Fletcher, S. J., Carroll, B. J., Lu, G. Q. (Max), & Xu, Z. P. (2017). Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nature Plants*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.207>
- Molesini, B., Pennisi, F., Cressoni, C., Vitulo, N., Dusi, V., Speghini, A., & Pandolfini, T. (2022). Nanovector-mediated exogenous delivery of dsRNA induces silencing of target genes in very young tomato flower buds. *Nanoscale Advances*, 4(21), 4542-4553. <https://doi.org/10.1039/D2NA00478J>
- Mosa, M. A., & Youssef, K. (2021). Topical delivery of host induced RNAi silencing by layered double hydroxide nanosheets: An efficient tool to decipher pathogenicity gene function of *Fusarium crown* and Raíz rot in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115, 101684. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101684>

- Mosquera, L. E., Alvarez, D. A., Ritter, T., Mockshell, J., Vera, D., & Dita, M. (2023). *Banana value chain profile for Ecuador: The world's largest exporter is at risk from Fusarium TR4*.
- Mumbanza, F. M., Kiggundu, A., Tusiime, G., Tushemereirwe, W. K., Niblett, C., & Bailey, A. (2013a). In vitro antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* and *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, *69*(10), 1155-1162. <https://doi.org/10.1002/ps.3480>
- Mumbanza, F. M., Kiggundu, A., Tusiime, G., Tushemereirwe, W. K., Niblett, C., & Bailey, A. (2013b). In vitro antifungal activity of synthetic dsRNA molecules against two pathogens of banana, *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* and *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, *69*(10), 1155-1162. <https://doi.org/10.1002/ps.3480>
- Muthee, A. I., Gichimu, B. M., & Nthakanio, P. N. (2019). Analysis of Banana Production Practices and Constraints in Embu County, Kenya. *Asian Journal of Agriculture and Rural Development*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.18488/journal.1005/2019.9.1/1005.1.123.132>
- Mwaka, H. S., Christiaens, O., Bwesigye, P. N., Kubiriba, J., Tushemereirwe, W. K., Gheysen, G., & Smaghe, G. (2022). First Evidence of Feeding-Induced RNAi in Banana Weevil via Exogenous Application of dsRNA. *Insects*, *13*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/insects13010040>
- Nerva, L., Sandrini, M., Gambino, G., & Chitarra, W. (2020). Double-Stranded RNAs (dsRNAs) as a Sustainable Tool against Gray Mold (*Botrytis cinerea*) in Grapevine: Effectiveness of Different Application Methods in an Open-Air Environment. *Biomolecules*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020200>
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in Public Health*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Noriega, D., Valencia, A., & Villegas, B. (2016). ARN de interferencia (ARNi): Una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos plaga. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, *19*(1), 25-35.
- Numata, K., Ohtani, M., Yoshizumi, T., Demura, T., & Kodama, Y. (2014). Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. *Plant Biotechnology Journal*, *12*(8), 1027-1034. <https://doi.org/10.1111/pbi.12208>
- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, *144*(1), 31-43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Orozco Vásquez, R. (s. f.). *El impacto del comercio del Banano en el desarrollo del Ecuador*.
- Orr, R., & Nelson, P. N. (2018). Impacts of soil abiotic attributes on Fusarium wilt, focusing on bananas. *Applied Soil Ecology*, *132*, 20-33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.06.019>
- Ouattara, B., Sérémé, D., Koala, M., Nitiéma, L. W., Koïta, K., Kaboré, E., & Wonni, I. (2023). Prevalence and Spatial Distribution of Badnavirus in the Banana (*Musa* spp) Major

Growing Areas in Burkina Faso. *American Journal of Plant Sciences*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.4236/ajps.2023.144028>

Pacheco Coello, R., Pestana Justo, J., Factos Mendoza, A., & Santos Ordoñez, E. (2017). Comparison of three DNA extraction methods for the detection and quantification of GMO in Ecuadorian manufactured food. *BMC research notes*, 10, 1-7.

Pesticide Action Network Europe (PAN Europe). (2005). *Newsletter 21*. PAN Europe. <https://www.pan-europe.info/resources/newsletters/archive/newsletter-21>

Pesticide Action Network Europe (PAN Europe). (2020, noviembre 5). *Banned Pesticides: 70 NGOs Demand EU Commission Puts End to EU Double Standards*. PAN Europe. <https://www.pan-europe.info/press-releases/2020/11/banned-pesticides-70-ngos-demand-eu-commission-puts-end-eu-double-standards>

Pimentel, D., & Burgess, M. (2014). Environmental and Economic Costs of the Application of Pesticides Primarily in the United States. En D. Pimentel & R. Peshin (Eds.), *Integrated Pest Management: Pesticide Problems, Vol.3* (pp. 47-71). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7796-5_2

Ploetz, R. (2015). Fusarium Wilt of Banana. *Phytopathology*®, 105(12), 1512-1521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>

Ploetz, R. C. (2015). Fusarium Wilt of Banana. *Phytopathology*®, 105(12), 1512-1521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0101-RVW>

Ploetz, R. C., & Evans, E. A. (2015). The Future of Global Banana Production. En *Horticultural Reviews: Volume 43* (pp. 311-352). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119107781.ch06>

Ploetz, R. C., Kema, G. H. J., & Ma, L.-J. (2015). Impact of Diseases on Export and Smallholder Production of Banana. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 269-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120305>

Qiao, L., Lan, C., Capriotti, L., Ah-Fong, A., Nino Sanchez, J., Hamby, R., Heller, J., Zhao, H., Glass, N. L., Judelson, H. S., Mezzetti, B., Niu, D., & Jin, H. (2021). Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, 19(9), 1756-1768. <https://doi.org/10.1111/pbi.13589>

Quevedo G, Ms. J., Infante N, I. C. J. C., & García B, D. C. R. M. (2018). Efecto del uso predominante de fungicidas sistémicos para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella Fijiensis* Morelet) en el área foliar del banano. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(1), Article 1.

Rodríguez-García, C. M., Canché-Gómez, A. D., Sáenz-Carbonell, L., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché, B., Islas-Flores, I., & Peraza-Echeverría, S. (2016). Expression of MfAvr4 in banana hojasections with black hojastreak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis*: A technical validation. *Australasian Plant Pathology*, 45(5), 481-488. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0431-6>

- Romero-Estévez, D., Yáñez-Jácome, G. S., Simbaña-Farinango, K., & Navarrete, H. (2019). Distribution, Contents, and Health Risk Assessment of Cadmium, Lead, and Nickel in Bananas Produced in Ecuador. *Foods*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/foods8080330>
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., & Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: Proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstoniapseudosolanacearum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_9), 3087-3103. <https://doi.org/10.1099/ijls.0.066712-0>
- Saquicela Cruz, P. S., Romanova, E. V., Guamán Guamán, R. N., Ulloa Cortázar, S. M., Villavicencio Abril, Á. F., Saquicela Cruz, P. S., Romanova, E. V., Guamán Guamán, R. N., Ulloa Cortázar, S. M., & Villavicencio Abril, Á. F. (2023). Caracterización morfológica y bioquímica de *Ralstonia solanacearum* raza 2, bacteria patógena en cultivos de banano y plátano en El Carmen, Manabí, Ecuador. *Siembra*, 10(1). <https://doi.org/10.29166/siembra.v10i1.4305>
- Sarkies, P., & Miska, E. A. (2014). Small RNAs break out: The molecular cell biology of mobile small RNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 525-535.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., Kohli, S. K., Yadav, P., Bali, A. S., Parihar, R. D., Dar, O. I., Singh, K., Jasrotia, S., Bakshi, P., Ramakrishnan, M., Kumar, S., Bhardwaj, R., & Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1446. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>
- Siamak, S. B., & Zheng, S. (2018). Banana Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense*) Control and Resistance, in the Context of Developing Wilt-resistant Bananas Within Sustainable Production Systems. *Horticultural Plant Journal*, 4(5), 208-218. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.001>
- The Gene Ontology Consortium, Aleksander, S. A., Balhoff, J., Carbon, S., Cherry, J. M., Drabkin, H. J., Ebert, D., Feuermann, M., Gaudet, P., Harris, N. L., Hill, D. P., Lee, R., Mi, H., Moxon, S., Mungall, C. J., Muruganugan, A., Mushayahama, T., Sternberg, P. W., Thomas, P. D., ... Westerfield, M. (2023). The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics*, 224(1), iyad031. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad031>
- Timm, E. S., Pardo, L. H., Coello, R. P., Navarrete, T. C., Villegas, O. N., & Ordóñez, E. S. (2016). Identification of Differentially-Expressed Genes in Response to *Mycosphaerella fijiensis* in the Resistant *Musa* Accession 'Calcutta-4' Using Suppression Subtractive Hybridization. *PLOS ONE*, 11(8), e0160083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160083>
- Trigos, Á. (2007). Encontrando el punto débil de los hongos. *El maravilloso mundo de los hongos. Universidad Veracruzana, Xalapa*, 91-96.

US EPA, O. (2015, octubre 29). *Pesticides Industry Sales and Usage 2008—2012 Market Estimates* [Reports and Assessments]. US EPA. <https://www.epa.gov/pesticides/pesticides-industry-sales-and-usage-2008-2012-market-estimates>

Viljoen, A., Mostert, D., Chiconela, T., Beukes, I., Fraser, C., Dwyer, J., Murray, H., Amisse, J., Matabuana, E. L., Tazan, G., Amugoli, O. M., Mondjana, A., Vaz, A., Pretorius, A., Bothma, S., Rose, L. J., Beed, F., Dusunceli, F., Chao, C.-P., & Molina, A. B. (2020). Occurrence and spread of the banana fungus *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cubense* TR4 in Mozambique. *South African Journal of Science*, *116*(11-12), 1-11. <https://doi.org/10.17159/sajs.2020/8608>

Voora, V., Larrea, C., & Bermudez, S. (2020). *Global market report: Bananas*. International Institute for Sustainable Development.

Wang, M., & Jin, H. (2017). Spray-Induced Gene Silencing: A Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends in Microbiology*, *25*(1), 4-6. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>

Wesseling, C., Barraza, D., & Partanen, T. (s. f.). Efectos por plaguicidas en la salud en los trabajadores bananeros. *Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional, Costa Rica*.

Wiegard, J. C., Schlüter, M. A. C., Burenina, O. Y., Kubareva, E. A., Klug, G., Grünweller, A., & Hartmann, R. K. (2021). Northern Blot Detection of Tiny RNAs. En M. Rederstorff (Ed.), *Small Non-Coding RNAs: Methods and Protocols* (pp. 41-58). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1386-3_5

Zand Karimi, H., & Innes, R. W. (2022). Molecular mechanisms underlying host-induced gene silencing. *The Plant Cell*, *34*(9), 3183-3199. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac165>

Zhang, W. (2018). *Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more*. 8, 1-27.

Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect molecular biology*, *19*(5), 683-693.

Zhu, Y., Zhang, Y., Duan, Y., Shi, D., Hou, Y., Song, X., Wang, J., & Zhou, M. (2021). Functional Roles of α 1-, α 2-, β 1-, and β 2-Tubulins in Vegetative Growth, Microtubule Assembly, and Sexual Reproduction of *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, *87*(20), e00967-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.00967-21>

Zotti, M., Dos Santos, E. A., Cagliari, D., Christiaens, O., Taning, C. N. T., & Smagghe, G. (2018). RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest management science*, *74*(6), 1239-1250.

Zumba, L. (2022). *El moko del banano: Una amenaza silenciosa*. www.expreso.ec. <https://www.expreso.ec/actualidad/economia/moko-banano-amenaza-silenciosa-121561.html>

ANEXOS

Anexo 1

Protocolo de extracción de ADN de hongos filamentosos

Materiales requeridos

- Isopropanol
- 70% Etanol
- Acetato de sodio 3M (pH 5.2)

Buffer de extracción

- 200mM Tris-HCl pH8.5
- 250 mM NaCl
- 25mM EDTA
- 0.5% SDS

Procedimiento

1. Tomar aproximadamente 10 - 50 mg de micelio de una colonia del hongo filamentosos y colocarlo en un tubo de microcentrífuga 1.5 ml.
2. Añadir 350 µl del buffer de extracción y triturar la muestra del micelio con la ayuda de un micropistilo estéril.
3. Añadir 150 µl de acetato de sodio (3M, pH 5.2) y mezclar haciendo un vortex por 30 segundos
4. Añadir 500 µl de isopropanol y dejar precipitar por 5 minutos a temperatura ambiente
5. Centrifugar a 1400 RPM por 5 minutos
6. Desechar el sobrenadante y añadir 50 µl de etanol al 70%, luego centrifugar a 1400 RPM por 2 minutos y eliminar el sobrenadante (Repetir este paso)
7. Secar el pellet en un concentrador al vacío por 10 minutos o dejar a temperatura con la tapa abierta por 20 min (si aún se observa residuo de etanol dejar por más tiempo)
8. Resuspender el pellet con 50 µl de agua ultra pura estéril o TE buffer
9. Cuantificar y almacenar a -20°C.

Anexo 2

Secuencia Completa de los genes objetivos en estudio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cupense* de la raza 1*Quitina sintasa 1*

>*FOC1_g10012728:ENH62496 cds:protein_coding*

ATGGCGTACAATGGCCGTGATCAGGAGTATGGAGGACATGCCTTGCAGG
ACCTTCTGCTGGCGGAAGCCAGTACCATCTCCCCCCCCAAGAGAACGAT
GAGGAGCAGGGCCGCGGCCTCTTGAACCTCGGGTTACGACCAAGATCGAC
TTGGCGCCCGCACTCCCCCGACCGCCCCGTCTCTGCTTACAGTCTCACTG
AGTCCTATGCCCTGGAGCCTCGTCAACCATGCCTGGCCAGGGACCTACT
GGATATGGTGATGGAGGCAGCTTTGGTCAGTTTGGTAACCTTGACGCCGC
TGCCCTTTCCCTCGCCCCGACTCTGCCTTCGATCCCGAAGACAGCTGGG
TTGAGCGACAGCAGCAGCCCCAGATGGGCGGTGGTCTTGGCCGCTCGAA
AACCCGAAAGATCAAGCTGGTTCAGGGTTCAGTTCTGAGCATTGATTACC
CTGTGCCAGTGCATCAAGAATGCTGTCCAGCCTCAGTATCGCGACGCT
GAGAGTGGTACCGAAGAGTTCCATAAGATGCGATATAACCGCTGCCACCT
GTGATCCCAACGACTTCACACTCAAGAACGGTTACGATTTGCGACCTCGC
ATGTACAACCGACACACTGAGTTGCTGATCGCCATTACATACTATAACGA
AGACAAGGTTCTTCTCGCACGAACACTGCATCACACCATGCAGAACATCC
GCGACATCGTCAACCTGAAGAAGTCGACCTTCTGGAACAAGGGCGGCC
AGCTTGGCAGAAGATCGTTGTATGCTTGGTTTTTCGATGGTATCGACAAGG
CTGACAAGAACACCCTGGATGTCCTTGCCACTGTCGGCGTGTACCAGGAC
GGTGTTATCAAGAAGGATGTCGACGGCAAGGAGACTGTTGCTCACATCTT
CGAATATAACAGCCAGCTTTCCGTCACGCCAACCAGCAGCTTATTCGAC
CCACAAACGAAGGCTCACAGAACTTGCCACCAGTTCAGATGATCTTCTGT
TTGAAGCAGAAGAACACCAAGAAGATTAACCTCGCATCGATGGTTGTTCA
ACGCCTTCGGCCGTATCTTGAATCCTGAGGTGTGTATCCTGCTCGATGCG
GGTACCAAGCCCAGTCCCCGATCTCTCCTTGCTCTTTGGGAGGGATTTTA
CAACGATAAGGACCTGGGAGGTGCTTGTGGTGAATTCACGCTATGTTGG
GTAAAGGCGGTAAGAACTGTTCAACCCCTCGTTGCCGTCCAGAATTC
GAGTACAAGATTTTGAACATTCTGGACAAGCCTCTCGAGTCTTCTTTTGG
TTATGTCTCTGTCTTGCCTGGTGCTTTCTCAGCCTACCGATTCGAGCCAT
CATGGGCCGTCCGCTGGAACAGTATTTCCATGGTGATCATACTTGTCTA
AGATGCTTGGTAAGAAGGGTATCGATGGTATGAACATTTTCAAGAAGAA
CATGTTCTTGGCCGAGGATCGTATTCTTTGTTTTGAGCTGGTCCCAAGGC
TGGCCAGAAGTGGCACTTGTCTATATCAAGGCTGCCAAGGGTGAACA

GATGTGCCCCGAGGGTGCAGCTGAATTCATTAGTCAACGTCGACGATGGCT
CAACGGTTCATTCGCTGCCACACTATACTCACTGATGCATTTTCGGACGAA
TGTACAAGTCGGGTCATAACATCATCCGCATGTTTTTTCCTCCACATTCAAC
TCATCTACACCACTCTCAACACTCTCTTCGCATGGTTCTCTCTTGGTTCTT
ATTGGCTTACAACATCCGTTATCATGGATCTTGTGGGTA CTCCCAACGCT
ACGTCCGGTTATCACGCCTGGCCATTCGGCGACACGGGTACACCTGTCGT
CAATGCCCTGCTTCAGTACCTCTACTTGGCCTTCGTCATGCTCCAGTTCAT
TCTGGCTCTTGGTAACAGGCCCAAGGGCTCCAAGTTCACATACATCGCTT
CCTTCATGGTCTTCAGTCTCATT CAGGGTTACATCCTGGTTCTCTCAGCCT
ACCTGGTTGTTTCGTGCTTTTGACACGCCATTGGAGACCAGATCTCTCGCT
CTTATCACCATCTATGGACTCAATTTTGTTCGCTCGTTTCTTTCCCTACTA
TCTACTTCTCATGTCGACTTACATCAACATTCTCATGGTTTATGCCTTCAA
CAACTGGCACGATGTCTCCTGGGGTACTAAGGGCTCAGACAAGGCTGAG
GCACTTCCCTCTGCCACGTCACCAAGGGTGAGAAGAACGAGGTTGTTGT
CGAGGAAGTTGAGAAGGAGCAGGAGGATATCGACAGTCAATTCGAGCAG
ACTGTCCGCCGAGCTCTTGCTCCCTTCAAGGAGGAGGAAGAGGTTGAGA
AGGCCGATGTTGAGGATGGTTACAAGTCTTTCCGAACAGGACTCGTCGTC
AGCTGGTTGTTTCGGAAACATTCTCCTTATTGTCTGCATTACCAGCGACAA
GTTTGATAACCTCGGATGGGGTGAACCTGCCACAGATCGCAAGGCGCATT
ACTTCCAGTTCCTTCTGTACGCTACTGCCGTGCTCTCGCTCGTTCGTTTTG
CCGGTTTTCTTGTGGTTCCTGGGCAGGACTGTGCTACTTGTCTTACACTATC
CTACAACCTCACCTTTGTATCGTGCCTGGGCTCTCGCACTCCATTTTCTGT
CATCTCATCAAGGTCTTTCCACAGCGCATAGCGACACAGCCCAAACCTGG
GCCCCACATCCACGATGTTGAAGATATGGTCGATGAAAAAGGAGCAGA
AGGAGGCAGAGAACGCAGAGGGCCAGGCGACGGGTGGCAAGAAGAAGA
AGGTGACTGCAGCTCAGCTGCGCGTGCAAAAAGATCTTTCAGAACTTTCC
CTCGGATCGACGATGAAGACAGAGTTCCTCCGACCCCGATGACATCCTTAA
CTTCGTA CTACGATCGACCCTGATGAGGGTATGTACCGAGGCAGCCGCT
TTACCTTCGATTTACCATAAACCAGAACTTTCCCCACGAGCCTCCCAA
GTCCGATGCCGAGAAAAGATCTACCATCCCAATATCGATCTTGAGGGCA
AGGTCTGCCTGAACATTCTACGAGAGGATTGGAAGCCAGTGCTGAACTTG
AATGCTGTGATTGTTGGCCTGCAGTTCCTGTTCTCGAACCCAACGCATC
GGACCCGCTCAACAAGGAGGCAGCTGAGGATCTACGAAACAACCGAGAG
GGATTCAAGCGCAACGTGAGGACTGCTATGGGTGGCGGAGTAGTCAAGG
GCAGGACATACGACAGGGTCTGAAATAG

C5 – Esterol desaturasa – ERG3*>FOC1_g10010052:ENH74632 cds:protein_coding*

ATGGACGTCGTCCTCGAGGTCGTCGATACCTTTATCGCCGATTACGCATA
 CTCCTACTTTACCCAAAGCCTCCAGCTCCTTATGATTTCCCATCGCCCTC
 AACTCGACAGATACGTCCGCAAGGCCTTCTCAACATGGACTTACAAG
 CCGGCCACTCAATTCATCACGCTTGAGCCAGCAGAGGAGGCATACATGA
 GCGCTTGGGATCGTGACAACCCTCTTCGACAAGCTCTGACTCTATATCTT
 ATCACTTGGATCTTTGGGCTTCTCGTCTACTTCATCGTCGCGACTCTCA
 TACATCTTCATCTTCGACAAGCGAACATTTGACCACCCTCGCTTCATCAA
 GAACCAAGTCCGCCTTGAAATCATTGCAGCCAACAAGGCCATGCCCGTC
 ATGGCCATCATCACAGCACCCTTCTTCCTCCTTGAAATGGTGCTCTTCCTC
 CTCTTACCAGCTTCTGCATCTACTGGGCTCATCGCTGGCTTACCACCGC
 CTGGTCTACAAGTACCTGCACAAGCTTACCACAAGTGGATCATGCCTAC
 ACCCTTTGCTAGCCATGCTTTCCACCCTCTCGATGGCTTACCAGTCATT
 GCCATAACCACATCTTCCCCTTTATCTTCCCGCTCCAGAAGATGGCATATGT
 GCGCTCTTCGTATTCGTGAACCTCTGGTCTGTTATGATTCACGATGGCG
 AGTATCTACCAACAACCCCGTTGTCAACGGCGCTGCTTGCCACTCTCTC
 CACCCTCTCGCTTTGAGGTCAATTACGGCCAGTTCTTCACTGGCTTTGAC
 CGCATGGGTGGCACATATCTCATGCCTGAGCAGTGGATGTTTCGAGCGTAA
 TATGAAGATGTCAGAGGGCCGATGGAAGAAGGAGATTGAGAAGGTGGAT
 GAGCTTATTGAAGAGATCGAAGGTAAAGACAACCGCACATACGGTTCGT
 CTAGCACCAAGAAGACCCAATAG

Beta tubulina*>FOC1_g10011241:ENH73921 cds:protein_coding*

ATGCGTGAGATTGTTACCTCCAGACCGGTCAGTGCGGTAACCAAATCGG
 TGCTGCTTTCTGGCAAACCATCTCTGGCGAGCACGGCCTCGACAGCAATG
 GTGTCTACAACGGTACCTCCGAGCTCCAGCTCGAGCGCATGAGTGTCTAC
 TTCAACGAGGCCTCTGGCAACAAGTATGTTCCCCGAGCCGTCCTCGTCGA
 TCTTGAGCCTGGTACCATGGACGCCGTCCGTGCTGGTCCCTTCGGTCAGC
 TCTTCCGTCCCGACAACCTTCGTTTTCCGGTCAGTCCGGTGCTGGAAACAAC
 TGGGCCAAGGGTCACTACTGAGGGTGCCGAACCTTGTCGACCAGGTCCCT
 CGACGTCGTCGCCCGTGAGGCCGAGGGCTGCGATTGCCTCCAGGGTTTCC
 AGATCACCCACTCTCTCGGTGGTGGTACCGGTGCCGGTATGGGTACTCTG
 CTCATTTCAAAGATCCGCGAGGAATTTCCCGACCGAATGATGGCCACCTT
 CTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCTCTGACACCGTCGTTGAGCCCTACA
 ATGCTACCCTCTCCGTCCACCAGCTGGTTCGAGAACTCCGATGAGACCTTC
 TGTATCGATAACGAGGCCCTCTACGATATCTGCATGCGCACCCCTGAAGCT
 GTCCAACCCCTCCTACGGTGACCTCAACTACCTCGTTTCTGCTGTCATGTC

CGGTGTCACCACCTGTCTCCGTTTCCCCGGTCAGCTGAACTCCGACCTCC
 GAAAGCTCGCCGTCAACATGGTGCCTTTCCTCGTCTACACTTCTTCATGG
 TTGGCTTTGCTCCTCTGACCAGCCGTGGTGTCTCCCTCTTTCGCGCAGTCA
 GCGTTCCTGAGTTGACCCAACAGATGTTTCGACCCCAAGAACATGATGGCC
 GCTTCGGACTTCCGCAACGGTCGCTACCTGACCTGCTCGGCCATTTTCCGT
 GGCCGTGTCGCTATGAAGGAGGTGAGGACCAGATGCGCAACGTCCAGA
 ACAAGAACTCTTCTTACTTCGTTGAATGGATTCCCAACAACATCCAAACA
 GCCCTTTGTGCCATCCCTCCCCGAGGACTTACGATGTCCTCGACCTTCATC
 GGAAACTCCACCTCTATCCAGGAGCTCTTCAAGCGTGTTGGTGAGCAGTT
 CACTGCCATGTTCCGACGCAAGGCTTCTTGCATTGGTATACTGGTGAGG
 GTATGGACGAGATGGAGTTCCTGAGGCCGAGTCTAACATGAATGATCTT
 GTCTCCGAATACCAGCAGTACCAGGATGCTGGAATTGATGAGGAGGAAG
 AGGAGTACGAGGAGGAGCTCCCTGAGGGCGAGGAGTAA

adenilato ciclasa FocR1

>*FOC1_g10015438:ENH60638 cds:protein_coding*

ATGACCAGGAATGAGCCCTTCAACCGCATCGGCTCGATCACGAGCTCTAG
 CAGAAGCAAAATCAGAGGTAGCAGCAGCAGCAAAAGCAAAAGCAATGA
 TAACAGTCCGAGCACCGCAAGTGCCGAGAGTAGTACATACTTTGCGGTC
 ACCGTGAGATCCTCGTCACCATCTCAATCGCAATCGCAATCGCCCTCACC
 CTCAACTGCCTCCACTACTCCCCTCCCGCTTCCGCTTCTACTATCTCCAC
 TCCCATTCCCCTACTCGCCTACTCCCAATCCGGCACCTAACGTTGATAC
 TCTAACACCAACTCCATCATCCTCCGCTGCTGCTCCCGTTGCGACAGCTTC
 CCCTGCTGTTGCTGCTGCTACCACCTCTAATACCTCGACATTCTCCTCGAC
 GCCTCGCCAGCAACCAACCCCTACTCCTTCTGCTCGCCCAAGCGCTGATG
 GCAATGCTTCATTGAGCAACCCTTGGTCCCTTCAAGGATGAGCCTCAG
 CTCTCACCAACTGCTACAAACTTCGCCCCCTCGCGCCGGCGCCAATGCCCA
 TCCCAAAGACCGTCGCATGAGCGACCTCACCAATTATCGACGTGAGCTCG
 CCGTTCTCGAAACCTCCCGAGTCCCTCAGATCCACCAGATTCCGCCCACC
 GGCGGGCGGAGCCCTCAAATAGCCCCGTGGATGAACCAGCCTGGTTCCC
 CTACGACCTCTTCCAACATGCCGACCAGTTTCTTCAACGATTCGAGCGAC
 AACCTCTCCCTCGCCTCCAGCTTTCTCCGGGTCATCAGATCAGTAACCG
 CCAACCACATCAGCACCAGTATCCATCTCATCCCTCGCAACACGATGCCC
 CCGAGGCTTCATATTTTCGATGGCAGACGCCATCCGCTGCCAGTATCCTC
 ACAGCGAGCAGTCAGGGTAGCAAACTAGTATAACCAGAGGCGGTTTTTC
 GCAAACCTTCAGGGCTTCTTTGGCGAGGAATTCCTGGGCGCGATAGCTCG
 GATGGCAGCCTACCACTTCGCTCGCGGGCAAGGACCAGCGTGGACGCT

CTTATAGTCACAGCCGCCACACATAGAGATCGCAACTATTCCAATGCC
ACGGATCACACTCGCGATGCATCACCATCATCTTCGAGACCGAGAACTCC
AGTTCCTGCACCAGAGGTGGTGCCATTTCTATAACCAGGACAACAGTGACA
TCGCTCGATATGGCGAAGCTCCCGTCCGAGACATCATGACCGGACCCGAT
CGAGAGCGATATGTGGGTGATGGTTCCTCACAAATTCGCCAAAGACATC
GTCATCCTCGAGGTCGGGTCACTTCTATAGTTCACCTACCCGGGCATCACC
GACACCATAAGAGTAATGATGATCCTCGGACACTGCGGCCGACAATGAG
TAGGGACGATACAGCGATTGGCACGCAAATGTCGCGCGATCGTGGGGGC
AGTAGCGCCGTGTACTCAACCAAATCTAGAGGCCAAAGCCCGACACCAA
GACTAGAAAGTGCAGGAATGACTTGGAGCACGAAATCCTCCCAAGTTGA
TGGACAAACTTCACCCGGTCATCATCATGGCAAACGCGGAATCTTTGGAC
GACTTAGAAGGCATCACAAAGATAAAGATGACATTGCTAAACTTCGCGA
CCTACCTCAATCAACAAGATCTCTCCAGCCGAAGACCTCGAAGCCTGACT
TGCACCGCCCCAGCGATGTATCGACGACTACATTACCGTTCTCGGGGACC
TTTGTCCCTGGGGAGATGAGCGATGTGCCTGATATGCGACCAGTTCCGGG
TCAACGTGGCGCAACTTTCAACAATAAGTTCCCTTTCCGCAAGAAGGGAC
GAACTCATCGGCCTCATGACTATGTTGACGATGCAATTGGACCGACAGAT
CGTAACGATCCTAACAACATATATCATCTCGATACCAACCTGAACGATAT
GGAGGGCATCCTAACGAAACCTCCTCCACTTACACCTATGGATACTAGCT
TCGTAAACAATGTCGAGCCTGAGCGCCACGATTCCATTATCTCCACAGCG
CCTAAAGGCCGTTGGGATGCTCCTGACAGTTGGGCAGTGCGACGCAACA
CCGAAGATAACTCATACCATGGCCCTGAACCAGATGAGATCGGTAGCCC
CCCTCGCCCAGAAGAGAAAGCATCGCCATACTGCATTCTGAATCTTTGCT
CAGATGGTACATTCTCTACACATTCGATGCCTCTGGACTCGAATGTCACG
GATGTCATCTCACAAGTCATTAAGAAGACTTATGTGGTTGACGGTTTGA
GAACTATCATATTATCATGAAGAAGCATGATCTTATCAGGGTTTTGACAC
CACCTGAGCGACCCTTACTCATGCAGAAGCGGCTCCTGCAGCAAGTCGGT
TATGAGGAAAAGGATAGAATCGAAGATCTTGGCCGCGAAGACAACAGTT
ACCTCTGCAGGTTTCATGTTCTTGTCTGCGAGGGAGAGCGACTTTCATGCC
AAAACAACACTGACATGGGCCTGGCTCGGGCTCAGAAGCTTAATTACGTGG
ACCTCTCTGGTCGCAACCTCGTCACAATACCTATATCCCTATACTCAAAG
GCCATGGAGATTATCTCTCTGAACCTCTCGCGTAACCTCTCGCTCGACGT
CCCGCGAGACTTTATACAGTCTTGTAAACATCTTCGAGACATCAAGTTTA
ACAACAACGAAGCTAGGAAACTACCGCCAGTCTGAGTCGAGCAAACAG
ATTGACCTTTCTGGATGTTGCAAACAACCGGCTGGAGCAGTTGGAGCACG
CCGAGCTCAACTCTCTTACAGGGATGCTGAAGATGAACTTGGCCAACAAC
CGGCTTAAACACTTGCCTTCTTACTTTGGAGCATAACCAGTCACTTCGCTCT
CTCAATATTTCTTCTAACTTCCTCGACAAGTTCCCACTTTCTTGTGCAAT
CTACCAAGTTTGGTTGACCTGGATCTGAGTTTCAACGCCATTGCAACGAT
TCCTCACGAGATTGGCGGCCTGAAGAAGTGGAGAAATTGTTGATAACTA
ACAATAGACTTACGCACGCTGTACCAGCGTCATTTGGACAACTTGTGACG

CTACGCGAACTCGACATTAAGTACAATGGCATCTCGAGCATCGACATTAT
TTCGGAGCTCCCGAAGCTTGAGATTCTTTCCGCTGATCACAACCTGCGTCT
CTGCCTTTGTTGGACAGTTTGAGTCCCTTCGCCAACTCAAACCTGAACTCG
AACCCCTCAACAAATTCGAGATTGTTGCCCCCGTTCCTACACTCAAGAT
ATTGAACCTATCGAACGCTCAGCTTGCCAGTATTGACTCATCATTTCGTCA
ACATGGTCAACCTCGAGCACCTGATCCTGGATAAAAATTACTTCGTTTCG
TTGCCCAAGAAATCGGTACCTTGAGCAGACTCGAGCATTTCAGTATTGC
GAACAATTCCGTTGGAGAGCTACCAGCTCAAATTGGTTGCCTGACTGAAC
TGAGAGTGCTCAATGTTTCGAGGAAACAATATCTCCAAGCTGCCATGGA
GTTATGGTGGGCAAATCGACTGGAGACTTTCAACGCCTCTTCAAATGTTC
TGGAGCACTTCCCAAACCTGCTTCCAGAGCACCACGGATACCAGGAGA
GGAATCACAACCGGCGCCCCCTCCCGTCAATGGAAGAGCTGCGCCACTC
GGAACTCTGTTCGGCCACAGCAAGCTCCGAAGAGTTGTCAGACGATCGAA
GACCCAGTCAAATTCGAGCACACTTCTCAGTGTCGGACCGTCTCCTCTT
AACGCTGGCGACCGCAAGAGCTCTGTCTGTCTGTCTATGGGAAGGGTG
GCCGTAAGACCTCAGTTGTGTCTAGATCAGCAACTCCGTCGGCCCCCTACG
CAAACAGTCAACACCAGAAAAGATTCCGGGATGTCATCAAGGCTTAATA
ACACATTTGCTGGATCCCTTCGTAATCTTCACTTGGCCGATAACCGTCTGG
ATGACGATGTTTTTGATCAGATCACACTGCTCGCGGAGCTCCGAGTGCTC
AACTTATCTTACAACGACGAAATCAGTGACATGCCACAGAGATCGATCA
AGAACTGGCCTCAACTAGTTGAGCTTTATTTATCCGGAAACGCTCTCACG
ACATTCCTGCCGATGATCTAGAGGAGTCAAGTTTACTACAGGCACTTTA
CATCAACGGCAACAGGTTTACCAACTTGCCAGCCGATATCTCACGGGCTA
AGAACCTTGCTGTTCTCGATTGTGGCAGTAACTACCTGAAATACAACATC
TCCAACGTGCCCTATGATTGGAATTGGAATCTCAATCCGAACCTCAGATA
TCTGAATCTGTCTGGCAACAAGCGCCTGGAGATCAAGCAGACGAACACA
GGTCCCTTGGGCCTGGCGCCGTCAACCGTGAGGAGTATACAGACTTCAG
CCGTCTGCTTAACTTGCGTATCCTGGGTCTGATGGATGTCACTCTCACTCA
GCCAGTATTCCCGATCAGAGTGAGGACAGACGTGTCCGTACATCTGGAT
CACTCGCTGGCCACCTGCCTTATGGTATGGCCGATACTCTTGGCAAGCAC
GAGCACTTGTCAACGGTTGATCTCGTGGTACCAAGGTTCAACTCGTCAGA
AACAGAGATGCTCTTAGGCTTGTTTGATGGACAAGCTTTGTCCAGCGGTG
GATCCAAGATCGCTAAATACTTGCAATGAAAATTTTGGTCCATTTTCGCT
GGCGAACTGAAGCAGTTGAAAACACGATCGAATGAAACACCGGTTGATG
CACTACGACGCTCGTTCCTCCAGCTCAACAAGGATTTGGTCACTATTGCT
ATCCAGCAATCCGAGGAGCGGCCATTGAAGACGCATAGGGGCTCTGGCC
AGCCTGTAATACTCACCAAGGAAGACCTTAACTCAGGGGGTGTGGCAAC
TGTGGTTTATCTTCAAAGTACGGAATTATATGTTGCAAACGTCCGGTATG
CACAGGCGATGGTGATCCAAACAGATGGTACACATAAGATGCTGACCCG
CAAGCATGATCCTGCCGAGCCCAATGAGAGATCGCGCATTCGCGAAGCT
GGTGGATGGGTTTCTCGCAACGGCAGACTGAACGATCTACTCCAGGTTTC

ACGCGCCTTTGGATACGTTGACTTGATGCCGGCCGTACAAGCAGCACCCCT
ATGTCAGCAACATGACTATCCGAGAGCAGGATGACATTATCCTGATTGCG
ACTGGCGAGCTCTGGGAGTACCTGTCACCTGGTCTAGTGACGGATATTGC
GAGAGCCGAGAGACAAGATCTCATGCGAGCGGCCCCAGAAGCTTCGTGAC
CTGGCTATCGCATAACGGCGCCTCGGGCAAATTATGGTCATGATGATTAG
TGTTGCTGACCTAAAGCGACGGGTCTGAGCGATCCAGACTCCATCGCGGGT
CTAGTATGTGCTTTATCCATCTGGTATCCCTGATGACGCCAGGTTCTCA
ATACCAGGAGGGGCCGAAGGACGAAGGGCGATGTTCTCGATTCCATCCCT
AAACCGACTTGAGGCAGAGATCCCAGCACCTACGGGTAACGTGTCGATT
GTCTTCACCGATATCAAGAACTCGACAACACTCTGGGAGATGTACCCTAG
TGCCATGAGATCAGCTATCAAACCTCCACAACGAGGTCATGCGTCGACAG
CTGAGACGAATTGGTGGCTACGAAGTCAAGACTGAAGGTGACGCTTTTAT
GGTCTCCTTCCCAACAGCCACGTCCGCACTGTTATGGACGTTTGCCGTT
AGATGCAGCTCCTCGATGTGAACTGGCCATCAGAAGTCTTGAACCTCAGTG
TCTTGCCAGCCTGTTTATGACAAGGATAACAGTCTTATCTTCAAAGGACT
GTCGGTGCGAATGGGTATTCACTTTGGAGACTGTGTGAGTGAGACGGATC
CAGTTATCACGGTCTCGACCGACTTCATCTCGGAGATACAGCGGTGCCTG
GAGAATTATCAAGATACAGATCGCGGTAACGCTTCTGGCTCTGAGGATAC
CTTTGACGACGAGACATATGCTAGTGCCATTCGAAAGGATTTGAGATCCC
TCACCTCTCAAGGCTTTGAGGTTAAGGAAATGGGCGAGAAGAAGTTGAA
GGGTCTGGAAAACCCTGAGGTTGTGTACTCGCTCTACCCTCATGCATTGG
CTGGACGTATCGAATTCCACCTGCAGCATGAGAGGAAGGAAGAAGGAGG
AGGAGGCGGGCGGCATAAGCCAGCCGTCCTTGCACCCGGAGCAGAGCTC
AGTATCGACCCAGATGCAATTTGGACTCTTTGGAGAATTAGTTTGCGACT
TGAGATGCTTTGCAGCTCACTGGAAGGCAATGAAGCCCCAGGGCTACAA
CCACCGGAGACAGAACTGCTCGAGCGGATCAAGCAGCGTGGAGGAGAG
GTCACAGATCGCTTCTTGTGAACTTCTTGGAGCACCAAGTGAGCAGGAT
AGAGACCTGTATATCGACACTGGCGATGCGTCACCTTGCTACTGGTGGTG
GCCCTATTAAGGAACTAGAAGATCTCCAGGGCCCAATGACTGCGATCTTG
GATATGTTTCATGGCGCAGAGGAAGGAACTTGAGCGATACAGGAGGAAAT
ATGGTGCGCTGCCAAGCTCCTCCAGCAGCGAAGATGAAGACGATGACGA
CGACGACGACGATCCTGACACAGAAGAAGGGAGCGACACAGAGCAAGA
GTTGTGA

adenilato ciclasa FocRT4

>*FOC4_g10015430:EMT62341 cds:protein_coding*

ATGACCAGGAATGAGCCCTTCAACCGCATCGGCTCGATCACGAGCTCTAG
 CAGAAGCAAAATCAGAGGTAGCAGCAGCAGCAAAAGCAACGATAACAG
 TCCGAGCGCCGCAAGTGCCGAGAGTAGTACATACTTTGCCGGTCACCGTGA
 GGTCTCGTCTCCATCTCAATCGCAATCGCAATCGCCCTCACCTCAACT
 GCCTCCACTACTCCCGCTCCCGCTTCCGCTTCTACTATCTCCACTCCCATT
 CCCACTCACTCGCCTACTCCCAATCCGGCACCTAACGTTGATACTCTAAC
 ACCAACTCCATCATCCTCCGCTGCTGCTCCCGTTGCGACAGCTTCCCCTGC
 TGCTGCTGCTGCTACCACCTCTAATACCTCGACATTCTCCTCGACGCCTCG
 CCAGCAACCAACCCCTACTCCTTCTGCTCGCCAAGCGCTGATGGCAATG
 CTTCAATTGAGCAACCTTTGGTCCTCCTTCAAGGATGAGCCTCTGCTCTCAC
 CAACTGCTACAACTTCGCCCTCGCGCCGGCGCCAATGCCCATCCCAA
 GACCGTCGCATGAGCGACCTACCAATTATCGACGTGAGCTCGCCGTTCT
 CGAAACCTCCCGAGTCCCTCAGATCCACCAGATTCCGCCACC GGCGGCG
 CGAGCCCTCAAATAGCCCCGTGGATGAACCAGCCTGGTCCCCTACGACC
 TCTTCCAACATGCCGACCAGTTTCTTCAACGATTTCGAGCGACAACCTCTC
 CCTCGCTCCCAGCTTTCTCCGGGTCATCAGATCAGTAACCGCCAACCAC
 ATCAGCACCAGTATCCATCTCATCCTTCGCAACACGATGCCCCCGAGGCT
 TCATATTTTCGATGGCAGACGCCATCCGCTGCCAGTATCCTCACAGCGAG
 CAGTCAGGGTAGCAAACTAGTATAACCAGAGGTGGTTTTTCGCAAACTTC
 AGGGCTTCTTTGGCGAGGAATTCCCTGGGCGCGATAGCTCGGATGGCAGC
 CTACCCACTTCGCTCGCGGGCAAGGACCAGCGTGGACGCTCTTATAGTCA
 CAGCCGCCCCACACATAGAGATCGCAACTATTCCAATGCCACGGATCAC
 ACTCGCGATGCATCACCATCATCTTCGAGACCGAGAACTCCAGTTCCTGC
 ACCAGAGGTGGTGCCATTTCTATAACCAGGACAACAGTGACATCGCTCGAT
 ATGGCGAAGCTCCCGTCCGAGACATCATGACCGGACCCGATCGAGAGCG
 ATATGTGGGTGATGGTTCCTCACAAATTCCCCCAAAGACATCGTCATCCT
 CGAGGTCGGGTCATTCTATAGTTCACTTACCCGGGCATCACCGACACCAT
 AAGAGTAATGATGATCCTCGGACACTGCGGCCGACAATGAGTAGGGACG
 ATACAGCGATTGGCACGCAAATGTCGCGCGATCGTGGGGGTAGTAGCGC
 CGTGTACTCAACCAAATCTAGAGGCCAAAGCCCAGACCAAGTACCAGA
 AGTGCAGGAATGACTTGGAGCACGAAATCCTCCCAAGTTGATGGACAAA
 CTTACCCGGTCATCATCATGGCAAACGCGGAATCTTTGGACGACTTAGA
 AGGCATCACAAAGATAAAGATGACATTGCTAAACTTCGCGACCTACCTC
 AATCAACAAGATCTCTCCAGCCGAAGACCTCGAAGCCTGACTTGCACCGC
 CCCAGCGATGTATCGACGACTACATTACCGTTCTCGGGGACCTTTGTCCC
 TGGGGAGACGAGCGATGTGCTGATATGCGACCAATTCCGGGTCAACGT
 GCGCAACTTTCAACAATAAGTTCCCTTTTCGCCAAGAAGGGACGAACTCA
 TCGGCCTCAAGACTATGTTGACGATGCAATTGGACCGACAGATCGTAACG

ATCCTAACAAACATATATCATCTCGATACCAACCTGAACGATATGGAGGGC
ATCCTAACGAAACCTCCTCCACTTACACCTATGGATACTAGCTTCGTAA
CAACGTCGAGCCTGAGCGCCACGATTCCATTATCTCCACAGCGCCTAAAG
GCCGTTGGGATGCTCCTGACAGTTGGGCAGTGCGACGCAACACCGAAGA
TAACTCATACCATGGCCCTGAACCAGATGAGATCGGTAGCCCCCTCGCC
CAGAAGAGAAAGCATCGCCATACTGCATTTCGAATCTTTCGCTCAGATGGT
ACATTCTCTACACATTCGATGCCTCTGGACTCGAATGTCACGGATGTCAT
CTCACAAGTCATTAAGAAGACTTATGTGGTTGACGGTTTGGAGAACTATC
ATATTATCATGAAGAAGCATGATCTTATCAGGGTTTTGACACCACCTGAG
CGACCCTTACTCATGCAGAAGCGGCTCCTGCAGCAAGTCGGTTATGAGGA
AAAGGATAGAATCGAAGATCTTGGCCGCGAAGACAACAGTTACCTCTGC
AGGTTTCATGTTCTTGTCTGCGAGGGAGAGCGACTTTCATGCCAAAACAAC
TGACATGGGCCTGGCTCGGGCTCAGAAGCTTAATTACGTGGACCTCTCTG
GTCGCAACCTCGTCACAATACCTATATCCCTATACTCAAAGGCCATGGAG
ATTATCTCTCTGAACCTCTCGCGTAACCTCTCGCTCGACGTCCCGCGAGA
CTTTATACAGTCTTGTAACATCTTCGAGACATCAAGTTTAACAACAACG
AAGCTAGGAAACTACCGCCAGTCTGAGTCGAGCAAACAGATTGACCTT
TCTGGATGTTGCAAACAACCGGCTGGAGCAGTTGGAGCATGCCGAGCTC
AACTCTCTTACAGGGATGCTGAAGATGAACTTGGCCAACAACCGGCTTAA
ACACTTGCCTTCTTACTTTGGAGCATACCAGTCACTTCGCTCTCTCAATAT
TTCTTCTAACTTCCTCGACAAGTTCCCCACTTTCTTGTGCAATCTACCAAG
TTTGGTTGACCTGGATCTGAGTTTCAACGCCATTGCAACGATTCCCTCACG
AGATTGGCGGCCTGAAGAACTTGGAGAAATTGTTGATAACTAACAATAG
ACTTACGCACGCTGTACCAGCGTCATTTGGACAACCTTGTACGCCTACGCG
AACTCGACATTAAGTACAATGGCATCTCGAGCATCGACATTATTCGGAG
CTCCCGAAGCTTGAGATTCTTCCGCTGATCACAACCTGCGTCTCTGCCTTT
GTTGGACAGTTTGGAGTCCCTTCGCCAACTCAAACCTGAACTCGAACCCCT
CAACAAATTCGAGATTGTTGCCCCCGTTCCCTACTCAAGATATTGAACC
TATCGAACGCCAGCTTGCCAGTATTGACTCATCATTCGTCAACATGGTC
AACCTCGAGCACCTGATCCTGGATAAAAATTACTTCGTTTCGTTGCCCA
AGAAATCGGTACCTTGAGCAGACTCGAGCATTTCAGTATTGCGAACAATT
CCGTTGGAGAGCTACCAGCTCAAATTGGTTGCCTGACTGAACTGAGAGTG
CTCAATGTTTCGAGGAAACAATATCTCCAAGCTGCCCATGGAGTTATGGTG
GGCAAATCGACTGGAGACTTTCAACGCCTCGTCAAATGTTCTGGAGCACT
TCCCAAACCTGCTTCCAGAGCACACGGATAACCAGGAGAGGAATCACA
ACCGGCGCCCCCTCCTGTCAATGGAAGAGCTGCGCCACTCGAACTCTGT
CGGCCACAGCAAGCTCCGAAGAGTTGTTCGGACGATCGAAGACCCAGTCA
AAATTCGAGCACGCTTCTCAGTGTTCGGACCGTCTCCTCTTAACGCTGGCG
ACCGCAAGAGCTCTGTCTGTCTGTCTATGGGAAGGGTGGCCGTAAGACC
TCAGTTGTGTCTAGATCAGCAACTCCGTTCGGCCCCTACGCAAACAGTCAA
CACCAGAAAAGATTCCGGGATGTCATCAAGGCTTAATAACACATTTGCTG

GATCCCTTCGTAATCTTCACTTGGCCGATAACCGTCTGGATGACGATGTTT
TTGATCAGATCACACTGCTCGCGGAGCTCCGAGTGCTCAACTTATCTTAC
AACGACGAAATCAGTGACATGCCACAGAGATCGATCAAGAACTGGCCTC
AACTAGTTGAGCTTTATTTATCCGGAAACGCTCTCACGACATTGCCTGCC
GATGATCTAGAGGAGTCGAGTTTACTACAGGCACTTTACATCAACGGCAA
CAGGTTTACCAACTTGCCAGCCGATATCTCACGGGCCAAGAACCTTGCTG
TGCTCGATTGTGGCAGTAACTACCTGAAATACAACATCTCCAACGTGCC
TATGATTGGAATTGGAATCTCAATCCGAACCTCAGATATCTGAATCTGTC
TGGCAACAAGCGCCTGGAGATCAAGCAGACGAACACAGGTCCTCTTGGG
CCTGGCGCCGTCAACCGTGAGGAGTATACAGACTTCAGCCGTTTGCTTAA
CTTGCGTATCCTGGGTCTGATGGATGTCACTCTCACTCAGCCCAGTATTCC
CGATCAGAGTGAGGACAGACGTGTCCGTACATCTGGATCACTCGCTGGCC
ACCTGCCTTATGGTATGGCCGATACTCTTGGCAAGCACGAGCACTTGTC
ACGGTTGATCTCGTGGTACCAAGGTTCAACTCGTCAGAAACAGAGATGCT
CTTAGGCTTGTTTGATGGACAAGCTTTGTCCAGCGGTGGATCCAAGATCG
CTAAATACTTGCATGAAAATTTTGGTCAATTTTCGCTGGCGAACTGAAG
CAGTTGAAAACACGATCGAATGAAACACCGGTTGATGCACTACGACGCT
CGTTCCTCCAGCTCAACAAGGATTTGGTCACTATTGCTATCCAGCAATCC
GAGGAGCGGCCATTGAAGACGCATAGGGGCTCTGGCCAGCCTGTAATAC
TCACCAAGGAAGACCTTAACTCAGGGGGTGTGGCAACTGTGGTTTATCTT
CAAAGTACGGAATTATATGTTGCAAACGTCGGTGATGCACAGGCGATGG
TGATCCAAACAGATGGTACACATAAGATGCTGACCCGCAAGCATGATCC
TGCCGAGCCCAATGAGAGATCGCGCATTGCGGAAGCTGGTGGATGGGTT
TCTCGAACGGCAGACTGAACGATCTACTCCAGGTTTCACGCGCCTTTGG
ATACGTTGACTTGATGCCGGCCGTACAAGCAGCACCCCTATGTCAGCAACA
TGACTATCCGAGAGCAGGATGACATTATCCTGATTGCGACTGGCGAGCTC
TGGGAGTACCTGTCACCTGGTCTAGTGACGGATATTGCGAGAGCCGAGA
GACAAGATCTCATGCGAGCGGCCCAGAAGCTTCGTGACCTGGCTATCGC
ATACGGCGCCTCGGGCAAATATGGTCATGATGATTAGTGTTGCTGACC
TAAAGCGACGGGTCGAGCGATCCAGACTCCATCGCGGTGCTAGTATGTC
GCTTTATCCATCTGGTATCCCTGATGACGCCCAGGTTCTCAATACCAGGA
GGGGCCGAAGGACGAAGGGCGATGTTCTCGATTTCATCCCTAAACCGACT
TGAGGCAGAGATCCCAGCACCTACGGGTAACGTGTCGATTGTCTTCACCG
ATATCAAGAACTCGACAACACTCTGGGAGATGTACCCTAGTGCCATGAG
ATCAGCTATCAAACCTCACAACGAGGTCATGCGTCGACAGCTGAGACGA
ATTGGTGGCTACGAAGTCAAGACTGAAGGTGACGCTTTTATGGTCTCCTT
CCCAACAGCCACGTCCGCACTGTTATGGACGTTTGCCGTTTCAGATGCAGC
TCCTCGATGTGAACTGGCCATCAGAAGTCTTGAACCTCAGTGTCTTGCCAG
CCTGTTTATGACAAGGATAACAGTCTTATCTTCAAAGGACTGTCGGTGCG
AATGGGCATTCACCTTGGAGACTGTGTGAGTGAGACGGATCCAACGGAT
CCAGTTACACGACGCATGGATTATTTCCGACCCATGGTGAACAAGGCGG

CTCGAATCTCTGCGGTTCGCAGACGGTGGACAGATCACGGTCTCGACCGAC
TTCATCTCGGAGATACAGCGGTGCCTGGAGAATTATCAAGATACAGATCG
CGGTAACGCTTCTGGCTCTGAGGATACCTTTGACGACGAGACATATGCTA
GTGCCATTCGAAAGGATTTGAGATCCCTCACCTCTCAAGGCTTTGAGGTT
AAGGAAATGGGCGAGAAGAAGTTGAAGGGTCTGGAAAACCCTGAGGTTG
TGTA CTGCTCTACCCTCATGCATTGGCTGGACGTATCGAATTCCACCTGC
AGCATGAGAGGAAGGAAGAAGGAGGAGGAGGAGGCGGCGGCGATAAGC
CAGCCGTCCTTGCACCCGGAGCAGAGCTCAGTATCGACCCAGATGCAATT
TGGACTCTTTGGAGAATTAGTTTGCGACTTGAGATGCTTTGCAGCTCGCT
GGAAGGCAATGAAGCCCCAGGGCTACAACCACCGGAGACAGAACTGCTC
GAGCGGATCAAGCAGCGTGGAGGAGAGGTCACAGATCGCTTCTTGTTGA
ACTTCTTGAGCACC AAGTGAGCAGGATAGAGACCTGTATATCGACT
GGCGATGCGTCACCTTGCTACTGGTGGTGGCCCTATTAAGGAACTAGAAG
ATCTCCAGGGCCCAATGACTGCGATCTTGGATATGTTTCATGGCGCAGAGG
AAGGAACTTGAGCGGTACAGGAGGAAATATGGTGCGCTGCCAAGCTCCT
CCAGTAGCGAAGATGAAGACGATGACGACGACGACGACGATCCTGACAC
AGAAGAAGGGAGCGACACAGAGCAAGAGTTGTGA

Anexo 3

Resultado de la alineación de secuencias de los genes objetivos de FocR1 y FocRT4 en la base de datos del NCBI

Target gene		Query Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Beta tubulin	<i>β-tubFocR1</i>	FOC1_g10011241:ENH7392 1 cds:protein_coding	2433	2433	100%	0.0	99.40%	1341	Query_793028 1
	<i>β-tubFocTR4</i>	FOIG_05875:EXM02915 cds:protein_coding							
C5 - Sterol desaturase	<i>ERG3FocR1</i>	FOC1_g10010052:ENH7463 2 cds:protein_coding	966	1771	99%	0.0	99.25%	1044	Query_693286 5
	<i>ERG3FocTR4</i>	FOIG_08856:EXL98895 cds:protein_coding							
Chitin synthase 1	<i>Chs1FocR1</i>	FOC1_g10012728:ENH6249 6 cds:protein_coding	3674	4655	78%	0.0	99.12%	2106	Query_723467 3
	<i>Chs1FocTR4</i>	FOIG_07229:EXM01719 cds:protein_coding							
adenylate cyclase	<i>AdcyFocR1</i>	FOC1_g10015438:ENH6063 8 cds:protein_coding RT1	10765	12197	99%	0.0	99.46%	6804	Query_757175
	<i>AdcyFocTR4</i>	FOC4_g10015430:EMT6234 1 cds:protein_coding RT4							

Anexo 4

Genes relacionados con el proceso biológico de los genes objetivos del estudio*

Biological process	GO Accession	Ensembl ID	Genomic location (strand)	Description
chitin biosynthetic	GO:0006031	FOC1_g10001336	KB729983:48523-50092(1)	Chitin synthase 3
		FOC1_g10010918	KB730323:676103-678929(-1)	Chitin synthase 3
		FOC1_g10003633	KB730401:119537-122593(-1)	Chitin synthase 1
		FOC1_g10008163	KB730431:185466-189065(1)	Chitin synthase 2
		FOC1_g10012728	KB731259:348758-353017(-1)	Chitin synthase 1
lipid biosynthetic	GO:0008610	FOC1_g10010032	KB730034:677993-679143(1)	Sphingolipid C4-hydroxylase SUR2
		FOC1_g10010052	KB730034:742815-743871(-1)	Putative C-5 sterol desaturase
		FOC1_g10008889	KB730083:330648-331769(-1)	Alkylglycerol monooxygenase
		FOC1_g10012447	KB730192:727625-728695(1)	Putative C-5 sterol desaturase
		FOC1_g10012083	KB730216:1011408-1012957(1)	Putative squalene synthase
		FOC1_g10014293	KB730248:827493-828692(1)	Ceramide very long chain fatty acid hydroxylase SCS7

		FOC1_g10003 709	KB730278:32834- 33583(-1)	hypothetical protein
		FOC1_g10003 420	KB730470:136563- 137585(1)	hypothetical protein
		FOC1_g10005 182	KB730484:236706- 237756(1)	C-4 methylsterol oxidase
		FOC1_g10007 914	KB730535:132961- 135711(1)	hypothetical protein
microtubule- based	GO:00070 17	FOC1_g10011 241	KB730051:726807- 728476(-1)	Tubulin beta chain
		FOC1_g10009 478	KB730215:529455- 531148(-1)	Tubulin beta chain
		FOC1_g10012 782	KB731259:563807- 565664(-1)	Tubulin gamma chain
		FOC1_g10015 403	KB731261:192599- 194745(1)	Dynactin subunit 2
		FOC1_g10015 957	KB731261:1869544- 1871256(-1)	Tubulin alpha chain
		FOC1_g10016 158	KB731261:2485908- 2486578(1)	Dynein light chain, cytoplasmic
		FOC1_g10016 264	KB731261:2814774- 2816477(-1)	Tubulin alpha chain
cAMP biosynthetic	GO:00061 71	FOC1_g10015 438	KB731261:295105- 302247(1)	Adenylate cyclase
cyclic nucleotide biosynthetic	GO:00091 90	FOC1_g10015 438	KB731261:295105- 302247(1)	Adenylate cyclase

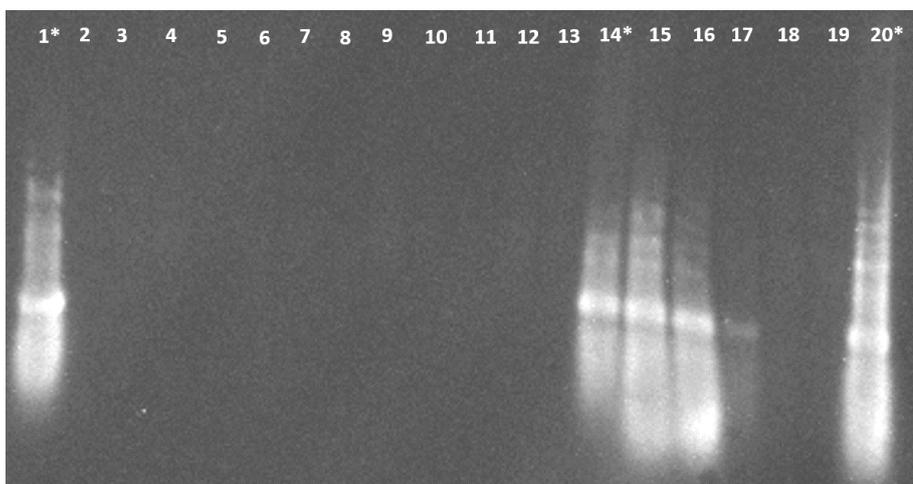
intracellular signal transduction	GO:003555 6	FOC1_g1000298 5	KB729968:213703- 215274(-1)	Developmental regulator flbA
		FOC1_g1000896 8	KB730083:502366- 503979(1)	1-phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase 1
		FOC1_g1000474 2	KB730230:46963- 48891(-1)	1-phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase 1
		FOC1_g1001026 9	KB730233:547895- 550336(-1)	Developmental regulator flbA
		FOC1_g1001459 6	KB730248:1677813 -1681094(-1)	1-phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase 1
		FOC1_g1001073 9	KB730323:190972- 194061(-1)	Rho guanine nucleotide exchange factor scd1
		FOC1_g1000511 2	KB730484:27747- 33260(-1)	Vacuolar membrane- associated protein iml-1
		FOC1_g1000687 7	KB730492:338649- 342458(1)	Rho1 guanine nucleotide exchange factor 1
		FOC1_g1001351 0	KB730528:146300- 150239(-1)	1-phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase 1
		FOC1_g1000922 4	KB731255:482455- 484194(-1)	1-phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase 1

		FOC1_g1001496 5	KB731260:947258- 950134(-1)	1-phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase 1
		FOC1_g1001543 8	KB731261:295105- 302247(1)	Adenylate cyclase

**Información extraída de la base de datos de EnsemblFungi (Información tomada en inglés)*

Anexo 5

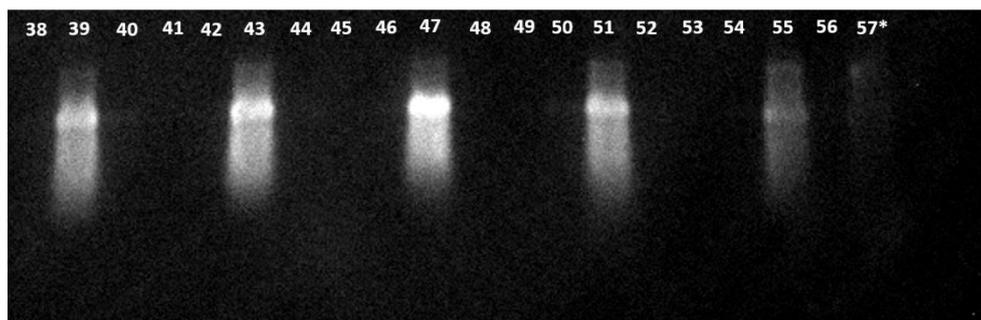
Resultados generales del Northern blot



Primera foto del resultado del Northern blot. Muestras del 1 al 20. Los detalles de cada muestra se pueden ver en la tabla luego de estos gráficos. * indica un control positivo del ARNdc.



segunda foto del resultado del Northern blot. Muestras del 21 al 37. Los detalles de cada muestra se pueden ver en la tabla luego de estos gráficos. * indica un control positivo del ARNdc.



tercera foto del resultado del Northern blot. Muestras del 38 al 57. Los detalles de cada muestra se pueden ver en la tabla luego de estos gráficos. * indica un control positivo del ARNdc.

Tabla de detalles de las muestras del resultado de Northern blot.

Muestra #	Tratamiento	Planta #	Tejido	Horas post aplicación (hpa)	Réplica #
1	ARNdc (10 veces diluido)-1	-	-	-	-
2	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	4	Raíz	1 hpa	R2
3	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	4	Cormo	1 hpa	R2
4	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	4	pseudotallo	1 hpa	R2
5	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	3	Raíz	1 hpa	R1
6	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	3	Cormo	1 hpa	R1
7	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	3	pseudotallo	1 hpa	R1
8	Solución control de agua+Triton X+DMSO	2	Raíz	1 hpa	R2

9	Solución control de agua+Triton X+DMSO	2	Cormo	1 hpa	R2
10	Solución control de agua+Triton X+DMSO	2	pseudotallo	1 hpa	R2
11	Solución control de agua+Triton X+DMSO	1	Raíz	1 hpa	R1
12	Solución control de agua+Triton X+DMSO	1	Cormo	1 hpa	R1
13	Solución control de agua+Triton X+DMSO	1	pseudotallo	1 hpa	R1
14	Solución de ARNdc+Triton X+DMSO (100 veces diluido)	-	-	-	-
15	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	4	hoja# 3	1 hpa	R2
16	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	3	hoja# 3	1 hpa	R1
17	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	3	hoja# 2	1 hpa	R1
18	Solución control de agua+Triton X+DMSO	2	hoja# 3	1 hpa	R1
19	Solución control de agua+Triton X+DMSO	1	hoja# 3	1 hpa	R2
20	Solución de ARNdc+Triton X+DMSO (10 veces diluido)	-	-	-	-
21	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	7	Raíz	12 hpa	R1

22	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	7	pseudotallo	12 hpa	R1
23	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	7	hoja# 4	12 hpa	R1
24	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	7	hoja# 3	12 hpa	R1
25	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	7	hoja# 2	12 hpa	R1
26	Solución control de agua+Triton X+DMSO	6	Raíz	12 hpa	R2
27	Solución control de agua+Triton X+DMSO	6	Cormo	12 hpa	R2
28	Solución control de agua+Triton X+DMSO	6	pseudotallo	12 hpa	R2
29	Solución control de agua+Triton X+DMSO	6	hoja# 4	12 hpa	R2
30	Solución control de agua+Triton X+DMSO	6	hoja# 3	12 hpa	R2
31	Solución control de agua+Triton X+DMSO	6	hoja# 2	12 hpa	R2
32	Solución control de agua+Triton X+DMSO	5	Raíz	12 hpa	R1
33	Solución control de agua+Triton X+DMSO	5	Cormo	12 hpa	R1
34	Solución control de agua+Triton X+DMSO	5	pseudotallo	12 hpa	R1
35	Solución control de agua+Triton X+DMSO	5	hoja# 4	12 hpa	R1

36	Solución control de agua+Triton X+DMSO	5	hoja# 3	12 hpa	R1
37	Solución control de agua+Triton X+DMSO	5	hoja# 2	12 hpa	R1
38	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	8	hoja# 4	12 hpa	R2
39	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	8	hoja# 3	12 hpa	R2
40	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	8	hoja# 2	12 hpa	R2
41	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	7	Cormo	12 hpa	R1
42	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	16	hoja# 4	48 hpa	R2
43	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	16	hoja# 3	48 hpa	R2
44	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	16	hoja# 2	48 hpa	R2
45	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	15	Cormo	48 hpa	R1
46	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	15	hoja# 4	48 hpa	R1
47	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	15	hoja# 3	48 hpa	R1
48	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	15	hoja# 2	48 hpa	R1
49	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	12	Cormo	24 hpa	R2

50	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	12	hoja# 4	24 hpa	R2
51	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	12	hoja# 3	24 hpa	R2
52	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	12	hoja# 2	24 hpa	R2
53	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	11	Cormo	24 hpa	R1
54	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	11	hoja# 4	24 hpa	R1
55	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	11	hoja# 3	24 hpa	R1
56	Solución de dsRNA+Triton X+DMSO	11	hoja# 2	24 hpa	R1
57	ARNdc (10 veces diluido)-2	-	-	-	-