



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción

“Caracterización de Actividad de Promotores de Banano e
Interacción *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis*”

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA AGRÍCOLA Y BIOLÓGICA

Presentada por

Sandra Lisette Hidalgo Pardo

GUAYAQUIL-ECUADOR

Año

2012

AGRADECIMIENTO

Al personal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), en especial a la Ph.D. Esther Peralta directora del centro, al Ph.D. Efrén Santos director de tesis por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi novio Mario por darme soporte en los momentos difíciles.

A mi padre por haber apoyado mis estudios universitarios.

A mi madre y mis hermanos por su motivación, guía y amor.



TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Gustavo Guerrero M.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Ph. D. Efrén Santos O.
DIRECTOR DE TESIS

M. Sc. Carlos Burbano V.
VOCAL

DECLARACION EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL."

(Reglamento de graduación de la ESPOL)



Sandra Lisette Hidalgo Pardo

RESUMEN

Una de las principales enfermedades que afecta la producción de banano es la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Los programas de mejoramiento convencional se centran principalmente en la producción de híbridos con resistencia a la Sigatoka negra. Los híbridos seleccionados son de alto rendimiento y resistentes a enfermedades pero usualmente pierden otras características deseadas a nivel de postcosecha como vida verde y maduración de la pulpa. Por otro lado, los avances en la biotecnología nos permiten realizar mejoramiento mediante ingeniería genética, siendo esta una alternativa a la mejora convencional en banano. Las plantas modificadas genéticamente necesitan que los genes insertados se expresen de una manera regulada mediante el uso de promotores. Con el fin de caracterizar diferentes promotores de banano para su posible uso en la generación de bananos cisgénicos para resistencia a Sigatoka negra, se determinó su actividad posterior a la transformación de suspensiones celulares embriogénicas de banano con promotores de la misma especie fusionados con el gen reportero GUS, mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se realizaron análisis histoquímicos y fluorométricos a los siete días, 11 semanas y 29 semanas después de la transformación, donde las células embriogénicas de banano pasaron por un proceso de selección y de regeneración en diferentes medios de cultivo. La actividad de los promotores quedó de la siguiente manera 35S>85-1>17-1 siendo el de mayor actividad el del

35S. Por otro lado, con el fin de estudiar la interacción que existe entre el hongo causante de la Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*, y las variedades de banano 'Williams' (susceptible), 'Calcutta-4' (resistente) y 'Tuu Gia' (resistente), se realizó un análisis sobre la penetración de hifas del hongo en los estomas de las hojas en condiciones controladas. De esta manera, se determinó el tiempo aproximado en el cual el hongo penetra a través de los estomas y la relación que existe con la resistencia a la enfermedad. Finalmente, los resultados relacionados con la interacción planta patógeno no mostraron diferencias significativas entre las variedades 'Williams', 'Calcutta-4' y 'Tuu Gia'.

ÍNDICE GENERAL

| | Pag |
|------------------------------------------------|-------|
| RESUMEN..... | VI |
| ÍNDICE GENERAL..... | VIII |
| ABREVIATURAS..... | XII |
| SIMBOLOGIA..... | XIV |
| INDICE DE FIGURAS..... | XV |
| INDICE DE TABLAS..... | XVIII |
| | |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| | |
| CAPÍTULO 1 | |
| 1. Generalidades..... | 5 |
| 1.1 Banano | |
| 1.1.1 Relevancia económica en el Ecuador..... | 8 |
| 1.1.2 Zonas de producción..... | 9 |
| 1.1.3 La Sigatoka negra..... | 10 |
| 1.1.3.1 Impacto en la producción Agrícola..... | 11 |
| 1.1.3.2 Agente Causal..... | 13 |
| 1.1.3.3 Sintomatología..... | 16 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1.3.4 Resistencia a la Sigatoka en variedades de <i>Musa</i> | 18 |
| 1.2 Mejoramiento en banano | 20 |
| 1.2.1 Mejoramiento convencional | 21 |
| 1.2.1.1 Metodología y ventajas del mejoramiento convencional. | 22 |
| 1.2.1.2 Restricciones y desventajas del mejoramiento convencional. | 24 |
| 1.2.2 Mejoramiento mediante transformación genética | 25 |
| 1.2.2.1 Importancia de la ingeniería genética en el desarrollo agrícola | 26 |
| 1.2.2.2 Técnicas de mejoramiento por transferencia directa de ADN | 27 |
| 1.2.2.3 Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 28 |
| 1.3 Promotores en Plantas | 31 |
| 1.3.1 Definición | 31 |
| 1.3.2 Estructura y función | 32 |
| 1.3.3 Importancia de los promotores dentro de la ingeniería genética de plantas. | 32 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3.4 Análisis de actividad de promotores mediante el uso de genes reporteros | 34 |
| 1.3.5 Promotores de banano | 36 |

CAPÍTULO 2

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. Metodología | 38 |
| 2.1 Caracterización actividad de promotores de banano | 38 |
| 2.1.1 Material vegetal | 38 |
| 2.1.2 Diseño experimental | 39 |
| 2.1.3 Transformación mediada por <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> | 40 |
| 2.1.4 Tratamientos | 43 |
| 2.1.5 Estimación de colonias de células embriónicas sobrevivientes..... | 43 |
| 2.1.6 Determinación de la actividad de promotores mediante la expresión del gen <i>uidA</i> ^{INT} | 44 |
| 2.1.7 Análisis bioinformático de promotores de banano | 45 |
| 2.2. Interacción <i>Musa</i> spp.- <i>Mycosphaerella fijiensis</i> | 47 |
| 2.2.1 Diseño experimental | 47 |
| 2.2.2 Variedades de banano | 48 |
| 2.2.3 Tratamientos | 48 |

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.4 | Conteo de estomas penetrados | 49 |
| CAPÍTULO 3 | | |
| 3. | Resultados y discusión | 52 |
| 3.1 | Caracterización de actividad de promotores | 52 |
| 3.1.1 | Eficiencia de transformación bajo diferentes concentraciones del agente selectivo | 52 |
| 3.1.2 | Análisis de la actividad de los promotores de banano..... | 55 |
| 3.1.3 | Análisis Bioinformático..... | 72 |
| 3.2 | Interacción <i>Musa</i> spp.- <i>Mycosphaerella fijiensis</i> | 75 |
| 3.2.1 | Penetración del hongo a través de los estomas. | 75 |
| 3.2.2 | Número de estomas penetrados por el hongo en variedades de <i>Musa</i> resistentes y susceptibles a la Sigatoka negra..... | 77 |
| CAPÍTULO 4 | | |
| 4. | Conclusiones y recomendaciones..... | 91 |
| 4.1 | Conclusiones..... | 91 |
| 4.2 | Recomendaciones | 92 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|-------------------------------------------------------------|
| PIB | Producto interno bruto |
| FHIA | Fundación Hondureña de Investigación Agrícola |
| IITA | Instituto Internacional de Agricultura Tropical |
| EMBRAPA | Empresa Brasileña de Pesquisa Agropecuaria |
| INIBAP | Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano |
| CIBE | Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador |
| 4x | Tetraploide |
| 2x | Diploide |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| T-DNA | Ácido desoxirribonucleico de Transferencia |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| TSS | Sitio de inicio de la transcripción |
| RT-PCR | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real |
| <i>luc</i> | Luciferasa |
| <i>ubil</i> | Gen de ubiquitina del maíz |
| <i>act1D</i> | Gen de actina del arroz |
| SCE | Suspensión de células embriogénicas |
| DCA | Diseño experimental completamente al azar |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |

| | |
|-------|-------------------------------|
| 2,4-D | Ácido 2,4-Diclorofenilacético |
| Hy | Higromicina |
| ANOVA | Análisis de Varianzas |
| dpi | Días después de inoculación |
| TAE | Solución Tris-EDTA |
| MM | Marcador molecular |
| bp | Pares de bases |
| FOB | Free on board |

SIMBOLOGIA

| | |
|-----------------|---------------------------------------------|
| ug | Micro gramo (Unidad de masa) |
| mL | Mili Litro (Unidad volumétrica) |
| Kg | Kilo gramos (Unidad de masa) |
| ha | Hectárea (unidad de área) |
| μm | Micro metro (Unidad de medida lineal) |
| °C | Grado centígrado (Unidad de temperatura) |
| mm | Mili metro (Unidad de medida lineal) |
| cm ² | Centi metro (Unidad de área) |
| mg | Mili gramo (Unidad de masa) |
| μM | Micro molar (Unidad de concentración) |
| nm | Nano metro (Unidad de longitud de onda) |
| mmHg | Mili metros de Mercurio (Medida de presión) |

INDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| FIGURA 1.1 CICLO DE VIDA DE <i>MYCOSPHAERELLA</i> <i>FIJENSIS</i> HONGO CAUSANTE DE LA SIGATOKA NEGRA. | 16 |
| FIGURA 1.2 ESQUEMA DEL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 30 |
| FIGURA 2.1 ESQUEMA DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO. | 42 |
| FIGURA 2.2 INOCULACIÓN ARTIFICIAL. | 49 |
| FIGURA 2.3 SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN. | 50 |
| FIGURA 2.4 TINCIÓN AL VACIO DE MUESTRAS INOCULADAS. | 51 |
| FIGURA 3.1 PORCENTAJE DE COLONIAS DE CELULAS EMBRIOGENICAS SOBREVIVIENTES. | 53 |
| FIGURA 3.2 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO | |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301..... | 57 |
| FIGURA 3.3 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PESKUL7..... | 58 |
| FIGURA 3.4 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO SIN TRANSFORMAR..... | 59 |
| FIGURA 3.5 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN COLONIAS DE CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301 EN SELECCIÓN CON HIGROMICINA (0 µg/ml)..... | 62 |
| FIGURA 3.6 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN COLONIAS DE CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301 EN SELECCIÓN CON HIGROMICINA (12.5 µg/ml)..... | 64 |
| FIGURA 3.7 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN COLONIAS DE CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301 EN SELECCIÓN CON HIGROMICINA (18 µg/ml)..... | 65 |
| FIGURA 3.8 PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO GUS..... | 66 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 3.9 EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO GUS (<i>UIDA^{INT}</i>), CALCULADO POR MEDIO DEL ANÁLISIS FLUOROMÉTRICO. | 68 |
| FIGURA 3.10 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN EMBRIODES DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301 EN SELECCIÓN CON HIGROMICINA (18 µg/ml) | 70 |
| FIGURA 3.11 RESULTADO DE LA PCR..... | 72 |
| FIGURA 3.12 ESTOMA PENETRADO..... | 79 |
| FIGURA 3.13 SINTOMATOLOGIA DE SIGATOKA NEGRA..... | 80 |

INDICE DE TABLAS

| | | Pág. |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TABLA 1 | Tipo de análisis, variables dependiente y de clasificación del experimento. | 40 |
| TABLA 2 | Prueba de rangos múltiples de Duncan por tratamiento..... | 60 |
| TABLA 3 | Descripción de muestras usadas en la PCR. | 72 |
| TABLA 4 | Conteo de estomas penetrados de plantas inoculadas con <i>Mycosphaerella fijiensis</i> | 76 |
| TABLA 5 | Prueba de Tuckey..... | 77 |

INDICE DE APENDICE

| | | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| APENDICE A | Modelo experimental | 76 |
| APENDICE B | Transformación de suspensión de células de banano mediada por <i>Agrobacterium</i> | 77 |
| APENDICE C | Protocolo del ensayo fluorométrico para medir actividad enzimática del gen GUS | 81 |
| APENDICE D | Resultado X-GLUC | 89 |
| APENDICE E | Primers | 90 |
| APENDICE F | Análisis de varianzas | 91 |
| APENDICE G | Resultado bioinformático | 94 |
| APENDICE H | Factores de transcripción..... | 95 |

INTRODUCCIÓN

El banano es una de los cultivos más antiguos del mundo. Desde su introducción al nuevo mundo en el siglo XVI ha sido considerado uno de los frutos más codiciados, no solo por su sabor, sino también por sus propiedades nutritivas. Los principales exportadores de este fruto son Ecuador, Colombia y Costa Rica. Las exportaciones de banano en el Ecuador incrementaron 1.7% en comparación al año 2010, mejorando la economía en un 5% para finales del 2011. [1]

Ecuador es el exportador número uno del mundo, representa alrededor del 30% de las exportaciones totales de banano [2]. Pero la producción de esta fruta se ve amenazada por la enfermedad Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. La forma más eficiente de controlar la enfermedad es a partir de la aplicación de fungicidas, que en muchos

casos no son usados adecuadamente generando la resistencia de este patógeno, contaminación y riesgos a la salud humana. [3[3, 4].

El mejoramiento de los cultivos mediante la ingeniería genética es una alternativa para el mejoramiento genético. Otra alternativa es el mejoramiento convencional, pero este abarca mayor tiempo para generar las plantas deseadas, especialmente en cultivos que se propagan vegetativamente como el banano y sus resultados no siempre concuerdan con las características solicitadas por el mercado, como sabor, tiempo de maduración, entre otros.[5]

Los productos transgénicos han pertenecido durante muchos años a mesas de debates y muchos países europeos no los admiten. Sin embargo, existen aun más alternativas que evitarían polémica, como lo es la generación de cisgénicos, lo cual involucra una transformación genética con genes, incluyendo sus secuencias regulatorias, de las mismas especies o especies familiarizadas[6, 7]

Los promotores son necesarios para el desarrollo de cultivos modificados genéticamente para expresar los genes de una manera regulada. Promotores aislados del cultivar de banano “Three Hand Planty” pueden ser utilizados en la generación de bananos cisgénicos. Para poder determinar la actividad de

los mismos, es necesario desarrollar estudios mediante fusión con genes reporteros como el *GUS* (*uidA*), seguido de la transformación genética de banano para su caracterización. Los resultados no solo podrán aportar con el avance biotecnológico del país, además contribuir en la mejora del banano y evitar finalmente el uso de fungicidas tóxicos para la salud humana.

La siguiente investigación está conformada por dos partes, una evalúa actividad de promotores en células embriogénicas transformadas de banano y la otra trata de comprender la interacción existente entre planta-patógeno

Teniendo en cuenta esto se formularon las siguientes hipótesis:

1. Existen diferencias significativas entre la expresión del gen *GUS* mediante el uso de los promotores 35S del virus del mosaico de la coliflor y los promotores de banano 17-1 y 85-1.
2. La eficiencia de selección de líneas transgénicas con una concentración del antibiótico higromicina de 18 ug/mL es mayor que con una concentración de 12.5 ug/mL.
3. La penetración del hongo *M. fijiensis* a través de los estomas de las hojas de plantas de banano es mayor en especies susceptibles que en especies resistentes.

Variables evaluadas:

Las variables en las dos primeras hipótesis fueron la actividad enzimática del producto del gen reportero *GUS*, número de puntos azules y número de colonias de banano sobrevivientes.

Para la tercera hipótesis se evaluó el número de estomas penetrados por variedad de *Musa* spp. Para comprobar las hipótesis de trabajo, se consideraron los siguientes objetivos principales:

- ✓ Conocer la actividad de los promotores de banano 17-1 y 85-1 mediante métodos histoquímicos y fluorométricos en muestras de banano genéticamente modificadas
- ✓ Observar la interacción *Musa* spp-*Mycosphaerella fijiensis* a través de inoculaciones controladas.

Objetivos específicos:

- ✓ Determinar la eficiencia de transformación mediante el conteo de número de colonias sobrevivientes.
- ✓ Establecer el número de puntos azules mediante análisis histoquímicos de las muestras transformadas.
- ✓ Determinar la actividad de los promotores a través de análisis fluorométricos.
- ✓ Establecer el período de penetración del hongo a través de los estomas de la planta.

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1 Banano

El banano es una fruta originaria de la región indomalaya donde aún se encuentran algunos tipos silvestres. En el centro de esta región predominan los tipos *Musa acuminata* debido a las condiciones de alta humedad. Por otro lado hacia la periferia, en India, son más comunes los híbridos triploides con *Musa balbisiana* ya que se adaptan mejor a zonas secas. Los

bananos luego llegaron a África, por las rutas India-Golfo Pérsico- Arabia- África Oriental, extendiéndose por todo el continente. Al continente Americano fueron introducidos después de la conquista por los años 1516.[8]

La planta de banano es grande, herbácea que consiste de un cormo subterráneo con raíces y de un pseudotallo aéreo formado por las bases envolventes de las hojas[8]. El tallo subterráneo, también conocido como cormo, crece en ramificaciones laterales de forma simpodial y es el verdadero tallo de la planta [9]. Cuando el cormo está bien desarrollado las raíces provienen de la parte superior del mismo y debajo de la inserción de las hojas, estas se extienden en forma horizontal y ramificada alcanzando una distancia de cinco metros mientras las raíces inferiores pueden llegar a una profundidad de un metro y medio[8]. El pseudotallo es la parte aérea de la planta, las bases foliares forman vainas envolventes que se traslapan a lo largo formándolo llegando a una altura de cinco metros, este a su vez ofrece apoyo a la planta, su estructura es resistente y puede soportar el peso de las laminas foliares así también la inflorescencia la cual llega a pesar 40 kg [9]. Por otro lado cuando la planta alcanza un estado crítico en su desarrollo el

punto de crecimiento apical ubicado en la base del pseudotallo deja de generar hojas e inicia el desarrollo de la inflorescencia, la misma está compuesta de flores femeninas, masculinas y hermafroditas[5].

El banano pertenece al orden Zingiberales, a la familia Musaceae y género *Musa*. Los cultivares comestibles se originaron de dos especies diploides silvestres *Musa acuminata* (A) y *Musa balbisiana* (B) y se han identificado 9 grupos de sus combinaciones: AA, AAA, AAAA, AB, AAB, ABB, AAAB, AABB y ABBB[5]. Los genotipos AA, AAB y ABB son los más numerosos; por otro lado AB, AABB, AAAB y ABBB son más raros. Los cultivares o clones más importantes en el cultivo de banano para consumo fresco son los de triploides AAA del subgrupo Cavendish ‘Williams’, ‘Gran Enano’, ‘Poyo’, y ‘Lacatan’, estos son cultivados para exportación [10, 11].

El cultivo del banano está presente en más de 120 países en zonas tropicales y subtropicales. El banano representa un alimento esencial y posee importancia socioeconómica y ecológica. En términos de producción agrícola a nivel mundial se ubican en el quinto puesto después de los cereales, azúcar,

café y cacao. Aproximadamente dos tercios del mundo de la exportación de banano es controlado por tres grandes corporaciones, Chiquita, Dole y Del Monte.[12]

Este cultivo es atractivo para los países en desarrollo debido a que es de tipo perenne. La fruta puede ser producida durante todo el año[13]. La exportación global de banano está concentrada en seis países: Ecuador, Costa Rica, Colombia, Filipinas, Guatemala y Panamá en este orden hasta el presente año.[14]

1.1.1 Relevancia económica en el Ecuador

La actividad bananera del Ecuador se remonta al año 1910. En aquella época se exportaban racimos hacia los mercados de Perú, Chile y Estados Unidos. En el año 1952 se convierte en el primer exportador de bananos al mundo. Hasta el 2011 Ecuador es el principal exportador de banano y cuarto productor en el mundo.[15, 16]

El Banano en el Ecuador representa un producto estratégico ya que aporta gran importancia económica,

genera fuentes de empleo, inversión y otros aspectos vinculados con esta cadena productiva[16]. El sector bananero absorbe el 90% de la producción de la industria cartonera del país y el 60% de la facturación de las empresas que venden insumos agrícolas, debido a esto se ha generado en estas industrias un desarrollo vertiginoso durante las dos últimas décadas.[17]

En el 2011 Ecuador marco un record de exportación en el sector bananero, exportó 284 millones de cajas. Dentro de las exportaciones acumuladas, de enero a noviembre del mismo año, banano y plátano representaron 2.047 millones de dólares (FOB) que representa un 10% de las exportaciones totales del 2011. En el 2010 el banano representó el 32% del Comercio Mundial del Banano, el 3.84 del PIB total; el 50% del producto interno bruto (PIB) Agrícola y el 20% de las exportaciones privadas del país[18].

1.1.2 Zonas de producción

La principal variedad de exportación es 'Cavendish', 'Valery' y 'Williams', además gracias a las condiciones

climáticas del país se logra tener una oferta de banano permanente durante las 52 semanas del año, cumpliendo con los altos estándares de calidad.[19]

Desde el 2007 al 2008, se ha registrado un crecimiento en la superficie sembrada del 10.2% y en la producción del 11.6%, respectivamente. Las principales provincias del cultivo de esta fruta son Los Ríos, El Oro, Guayas, Esmeraldas y Loja.[16]

En el 2009 el país registro 180,000 has cultivadas de banano en 9 provincias, la provincia del Guayas con 50,719 has, El Oro con 49,129 has y Los Ríos con 56,046 has esta última se destaca en la producción de esta fruta.[18] En el 2010 se registraron 232.939has de banano sembradas a nivel nacional llegando a producir 8.237.546 Tm de fruta fresca[20]. Finalmente en el 2011

1.1.3 La Sigatoka negra

La Sigatoka negra es originaria del pacífico sur entre Paupa Nueva Guinea y las Islas Salomón. La

enfermedad fue descrita por primera vez en Fíji en el Valle Sigatoka en 1963. [21]

En Centro América la enfermedad fue vista por primera vez en Honduras en 1972. En los años posteriores la enfermedad avanzo rápidamente, al inicio de los años 80 esta fue reportada en Nicaragua, Panamá, Colombia y al sur de Méjico. La Sigatoka negra luego avanzó hacia el sur de varias regiones de la costa del pacífico, incluyendo a Ecuador y Perú.[22]

Desde entonces la Sigatoka negra está presente alrededor de todo el mundo y es una de las enfermedades más destructivas para el cultivo de banano.[23]

1.1.3.1 Impacto en la producción Agrícola

Actualmente la Sigatoka Negra es una de las enfermedades más importantes en el cultivo de banano. La producción para exportación de los cultivares 'Cavendish' no sería posible sin la aplicación intensa y costosa de fungicidas[24].

Actualmente el país más afectado por esta enfermedad es Costa Rica, este país utiliza control químico aplicando entre 50 y 72. En Ecuador se utilizan de 12 a 28 ciclos de aplicación de fungicidas por año.[25]

La Sigatoka negra es una de las mayores restricciones que poseen las plantaciones comerciales de banano para exportar. Esta enfermedad tiene un gran impacto sobre el cultivo debido al ciclo y epidemiología del agente causal *Mycosphaerella fijiensis*. En los clones del subgrupo Cavendish este patógeno puede causar la muerte del tejido foliar especialmente en hojas jóvenes de la dos a la cinco, las cuales son fundamentales para la fotosíntesis y el desarrollo vegetativo de la planta, posterior a la floración la enfermedad las hojas son destruidas por la enfermedad ocasionando una maduración prematura en los frutos y una gran reducción en el rendimiento del cultivo. [26]

1.1.3.2 Agente Causal

La Sigatoka negra es causada por el ascomiceto, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Es un organismo heterotálico con ciclos de reproducción sexual y asexual. El término heterotálico se refiere a una especie constituida por individuos autoestériles (autoincompatibles), que para la reproducción sexual requieren la unión de gametos compatibles, sin considerar la presencia de ambos órganos reproductores, masculinos y femeninos, sobre el mismo individuo[27]. Pero, puede también referirse a una especie en la cual los sexos se presentan en talos separados, de modo que para la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes[28]. Posee una etapa anamórfica la cual se define como *Pseudocercospora fijiensis* Deighton. *M. fijiensis* es haploide, es un ascomiceto que parasita tejidos vivos, pertenece a la clase de los Dothideomycetes, orden Capnodiales, familia Mycosphaerellaceae y genero Mycosphaerella. [29]

Los conidióforos son de color pálido café- oliva, tornándose más claros hacia la punta. Usualmente son más angostos en la punta que en la base. Las conidias son verde pálido oliva, de forma ovalada con uno a 10 septos, se forman independientemente en el ápice del conidióforo, lateralizándose a medida que el conidióforo se desarrolla. El espermogonio tiene forma oval casi globosa, midiendo entre 55-88 μm por 35-50 μm , el ostiolo es ligeramente prominente y ubicado hacia el poro estomático. El peritecio puede variar en sus características pero generalmente es globoso con un diámetro de 25-45 μm , la pared de los peritecios es café oscuro con tres o más capas de células poligonales. Las ascosporas son de color hialino de 12.5-16.5 μm por 2.5-2.8 μm compuestas de dos celdas ligeramente más estrechas en el septo. [13, 28]

El ciclo de vida de *M. fijiensis* inicia con la deposición de la espóra, de tipo ascospora o conidios, sobre las hojas de la planta. Si las condiciones poseen niveles mayores al 90% de

humedad y la temperatura varía entre 26 a 28°C, las esporas germinarán. Al germinar la misma forma un tubo germinativo, el cual se extiende y se ramifica en busca de los estomas.

A partir de este punto inicia el proceso de penetración que tardará de 2 o 3 días si las condiciones son favorables. El hongo coloniza y genera sus cuerpos reproductivos liberando nuevas esporas y repitiendo así el ciclo. Como lo indica la FIGURA 1.1

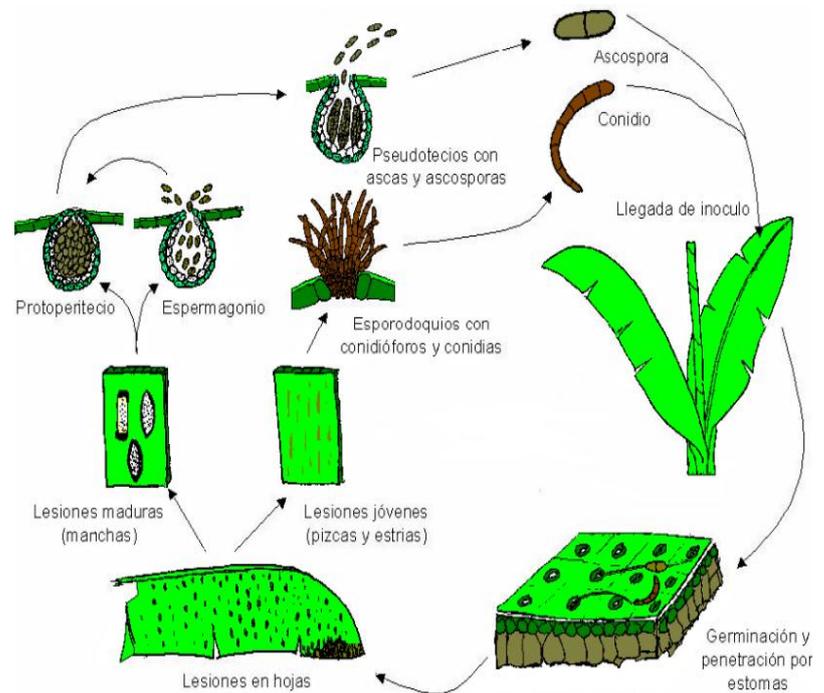


FIGURA 4.1 CICLO DE VIDA DE *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS* HONGO CAUSANTE DE LA SIGATOKA NEGRA.

Fuente: Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Burlington, MA, Elsevier Academic Press.

1.1.3.3 Sintomatología

Los primeros síntomas visibles son pequeñas manchas cloróticas menores a 1 mm de diámetro, aparecen en el envés de la hoja. Estas manchas generalmente son abundantes en el lado izquierdo de la hoja. Esto se debe a que

cuando la hoja se encuentra enrollada, y su lado izquierdo está expuesto al contacto con el patógeno. [22]

En el estadio dos de la enfermedad se observan las manchas alargadas y anchas, formando líneas de color café paralelas a las nervaduras de la hoja, especialmente en el envés.

Las rayas crecen en el estadio tres alcanzando una longitud de 20 a 30 mm. Además el color de las rayas se oscurece tornándose café oscuro a negro.

En el cuarto estadio las rayas se desarrollan formando manchas elípticas. La siguiente etapa de la enfermedad muestra dentro del centro de estas manchas tejido negro y totalmente necrótico. [22]

Finalmente la Sigatoka negra afecta a toda la hoja de la planta tornándola amarilla, café o negra impidiendo que la misma realice fotosíntesis, al depender de las reservas la planta reduce la producción de frutos. Para los exportadores esta enfermedad ocasiona pérdidas

económicas y causa que el fruto madure prematuramente.[30] El comportamiento de la enfermedad en Ecuador está fuertemente ligado al clima, la incidencia de los síntomas aumenta en épocas lluviosas.[3]

1.1.3.4 Resistencia a la Sigatoka en variedades de

Musa

Los patógenos que atacan a una planta necesitan vencer las barreras físicas antes de acceder a los nutrientes de la planta. Si la planta es incapaz de detectar la invasión de un patógeno, la misma no genera mecanismos de defensa permitiendo que se desarrolle la enfermedad. Por otro lado cuando la planta es capaz de identificar al patógeno la misma genera mecanismos de defensa y limita o bloquea el crecimiento del patógeno, evitando así la enfermedad.[31]

La interacción entre *M. fijiensis* y las Musas inicia a partir de la penetración, en donde después de esta etapa se define si la planta es resistente o

susceptible. Se pueden definir diferentes niveles de respuesta a la infección: altamente resistente, resistente, parcialmente resistente, susceptibles y altamente susceptibles.[13]

El mecanismo de reacción de las plantas altamente resistentes consiste en el bloqueo del desarrollo de los síntomas. Esta reacción está ligada a la hipersensibilidad que posee el hospedero, evitando la esporulación del patógeno. Las resistencias de este tipo son generadas por un gen de resistencia del hospedero o un número pequeño de genes de resistencia del hospedero, otorgándole a la planta una resistencia vertical, lo que permitiría al patógeno mutar fácilmente. Los cultivares que reaccionan de esta manera son 'Pisang Linlin' (AA), 'Tuu Gia' (AA) y 'Yangambi km5' (AAA).[13, 32]

La expresión parcial de la resistencia se caracteriza por el desarrollo normal pero lento de los síntomas desde su aparición hasta la

necrosis. Esta reacción le permite al patógeno esporular. La resistencia de este tipo es controlada por varios genes constituyéndola una resistencia durable o horizontal. Algunas de las variedades q se incluyen en este tipo de resistencia son 'Pisang Mas' (AA), 'Pisang Ceylan' (AAB) y 'Fougamou' (ABB).[13, 32]

Finalmente la susceptibilidad se caracteriza por la aparición normal y rápida de los síntomas. Donde el patógeno puede esporular profusamente, si las condiciones ambientales son favorables. Los cultivares importantes tipo Cavendish (AAA) caen en esta categoría entre los cuales tenemos a 'Dwarf Cavendish', 'Gran enano', 'Williams' y 'Robusta'.

1.2 Mejoramiento en banano

El interés en el mejoramiento del banano radica en el incremento de las diferentes enfermedades de este cultivo que afectan a su productividad. El mejoramiento de banano inició cerca al año 1922 en Trinidad y en 1924 en Jamaica. Actualmente existen diversos centros dedicados al

mejoramiento del banano tales como la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), Empresa Brasileña de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA). En 1984, la Sigatoka negra motivó la creación de la Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano (INIBAP). En Ecuador existe el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la ESPOL, donde se realizó esta investigación.[10]

1.2.1 Mejoramiento convencional

El mejoramiento convencional es el principal responsable del incremento de la producción agrícola del siglo pasado. La mayoría de variedades generadas a partir de este método generan resistencia a agentes bióticos y ambientales. [33]

El mejoramiento y selección para el banano de exportación es compleja debido a las exigencias del mercado internacional, provocando que se incurriera en la agricultura agresiva, competitiva, de altos niveles de productividad y calidad, esto muchas veces marca el fracaso o el éxito de las empresas productoras de banano[34].

1.2.1.1 Metodología y ventajas del mejoramiento convencional.

Consiste en la aplicación de los principios básicos de la genética basados en el fenotipo del organismo de interés. [35] El objetivo de cualquier programa de mejoramiento es desarrollar nuevos cultivares[36].

Incluyen la selección caracteres deseables. Como la calidad, rendimiento, enanismo en estatura, resistencia a enfermedades, fertilidad, entre otros. Finalmente estos caracteres se incorporación a través de cruce. [10]

El mejoramiento convencional de banano y plátano consiste en tres esquemas: a) diploide x diploide, b) triploide x diploide y c) tetraploide x diploide. El primer paso del mejoramiento convencional de bananos radica en evaluar la colección de

germoplasma natural, busca tipos sobresalientes que sirvan como progenitores.

El progreso del mejoramiento depende del mejoramiento de los diploides superiores para su cruzamiento con el progenitor triploide ($3x \times 2x$). El padre diploide debe estar constituido genéticamente con una combinación de resistencia a la enfermedad de interés, ser partenocarpico, poseer buenas características agronómicas y producir polen viable.

La mayoría de los bananos comerciales cultivados son triploides. La triploidia proporciona un cierto vigor a la planta pero contribuye también a la esterilidad, que frena considerablemente el mejoramiento de los bananos mediante cruzamiento y representa un reto para el mejoramiento convencional [37]. Para esto se utiliza el esquema $4x$ (tetraploides) \times $2x$ (diploide), cuyo producto se conoce como triploides secundarios estos

son usados en subsecuentes ciclos de cruzamiento convirtiéndose finalmente en líneas parentales del esquema 4x X 2x. En teoría es posible desarrollar híbridos triploides y tetraploides con valor comercial para uso en explotaciones comerciales y resistentes a las principales enfermedades.

1.2.1.2 Restricciones y desventajas del mejoramiento convencional.

En el caso de banano el mejoramiento genético depende del mejoramiento de los progenitores diploides, pero para esto es esencial la identificación y caracterización de los mismos. En la práctica, la producción de bananos híbridos triploides en el mejoramiento convencional para uso en explotaciones comerciales para exportación no ha sido todavía posible.[34]

Un programa de mejoramiento convencional en banano es dificultoso debido a los altos niveles de esterilidad, necesidad de

cruzamiento interploidal, baja proporción de germinación de la semilla y largos ciclos de cultivos [38]. Además, un programa por mejoramiento convencional puede proporcionar pocos híbridos. Los pocos híbridos seleccionados son de alto rendimiento y resistentes a enfermedades pero usualmente pierden otras características deseadas a nivel de postcosecha como vida verde y maduración de la pulpa llevando de esta manera al desuso de estos híbridos mejorados para la producción a gran escala. Asimismo los largos ciclos del cultivo, además de la poca producción de semillas y su difícil germinación en la producción de híbridos hacen del mejoramiento convencional en banano un método largo y complicado.[26]

1.2.2 Mejoramiento mediante transformación genética

Por otro lado la ingeniería genética es un tipo de modificación o transformación genética que involucra la transferencia, a un entorno genético nuevo, de genes

provenientes de fuentes ajenas, éstas pueden ser aislados de diferentes (micro)organismos que incluyen plantas, virus, bacterias, incluso animales [39] o sintetizados artificialmente. Estos genes, deben de ser estables en toda la planta, mantenerse durante diferentes generaciones y expresarse.[40]

1.2.2.1 Importancia de la ingeniería genética en el desarrollo agrícola

La utilización de la ingeniería genética para la transformación de plantas ha permitido la producción de cultivos transgénicos con características agronómicas de gran importancia económica. Actualmente existen varias estrategias para la producción de plantas transgénicas que poseen resistencia o tolerancia a virus, insectos, herbicidas, estrés ambiental. Además, otorgan calidad de producción del cultivo ya que se puede manipular la maduración del fruto, color y características fenotípicas de las flores o

frutos. Asimismo, se puede incluso mejorar la calidad nutricional de los alimentos [41].

Existen diferentes técnicas de transformación genética de plantas, la cual se divide en dos categorías: transferencia indirecta y transferencia directa. La transferencia indirecta es aquella que utiliza un vector como *Agrobacterium tumefaciens*, mientras que la transferencia directa de ADN se basa en métodos físicos o químicos tales como la biobalística, microinyección y electroporación de protoplastos [41].

1.2.2.2 Técnicas de mejoramiento por transferencia directa de ADN

La técnica de la ingeniería genética incluye tres partes básicas: identificación y aislamiento del gen responsable de una característica, preparación y modificación del gen que incluye la combinación con secuencias regulatorias como promotores y

terminadores, y finalmente la transferencia de este gen hacia la especie receptora.

El método por transferencia directa de ADN es la biolística. La cual consiste en un método físico, utilizado para introducir un ADN ajeno a la célula de la planta. La técnica consiste en adherir partículas de ADN a partículas metálicas, estas partículas son disparadas, por medio de una pistola, hacia la planta[42]. Esta metodología generalmente se utiliza en plantas que son recalcitrantes a ser transformadas con *Agrobacterium* o cuando se desea transformar cloroplastos.

1.2.2.3 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo que tiene un mecanismo molecular complejo el cual consiste en la integración de un fragmento de ADN de la bacteria al genoma de la planta. Este es un mecanismo natural que ha sido aprovechado por la

biotecnología como método de transformación de plantas.[43]

Un experimento de transformación típico de plantas consiste en recolectar tejido vegetal e incubarlas con células de *A. tumefaciens* que contienen el gen de interés en su plásmido. Luego de varias horas la bacteria ha transferido su plásmido a las células de la planta con el gen de interés (FIGURA 1.1). Luego, se regeneran en plantas los tejidos vegetales utilizados, por medio de cultivos nutritivos con hormonas que promueven el crecimiento de órganos diferenciados.[42]

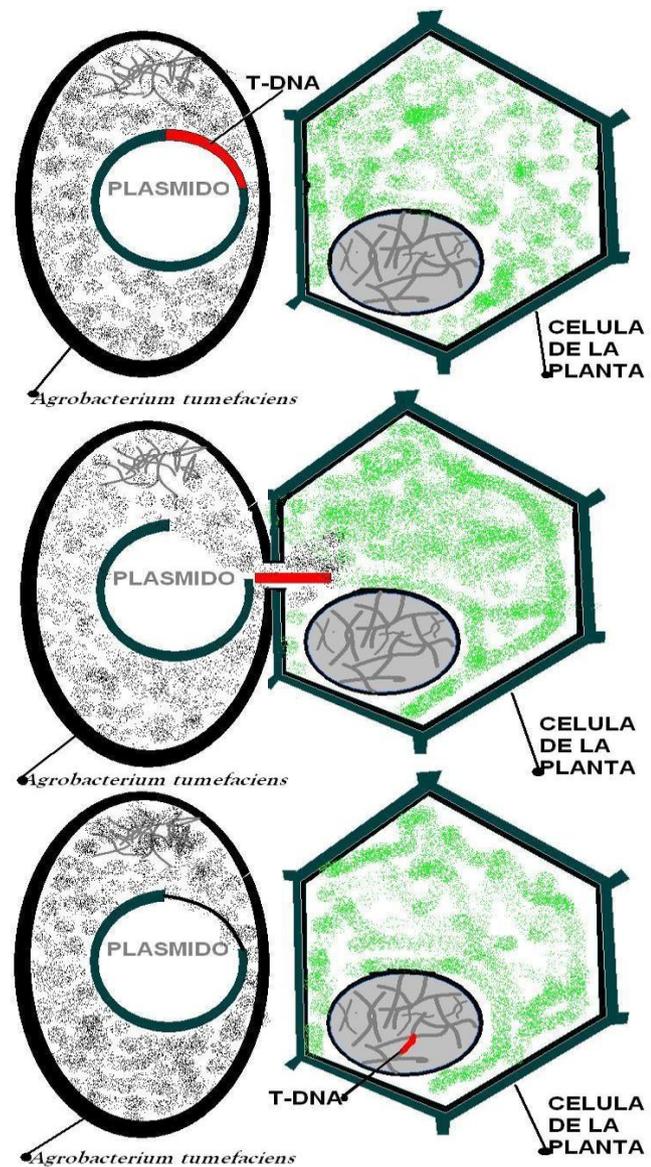


FIGURA 1.2. ESQUEMA DEL PROCESO DE TRANSFORMACIÓN MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens*. Se observa la transferencia del T-DNA de la bacteria hacia la célula vegetal. FUENTE: Centro de

Investigación Biotecnológica del Ecuador,
Laboratorio de Biología Molecular.

1.3 Promotores en Plantas

La regulación de genes dentro de los organismos vivos es un proceso complejo. Los genes son activados o desactivados dependiendo de la interacciones entre los promotores y los factores de transcripción.[42]

1.3.1 Definición

La estructura básica necesaria para la expresión de un gen se denomina promotor [44]. El promotor es una región secuencia de ADN ubicada en el 5' del gen antes del punto de inicio de la transcripción de los mismos, en la que el complejo enzimático se acopla para iniciar la transcripción. Los promotores contienen secuencias conservadas las cuales son requeridas para la unión específica entre factores de transcripción y para el inicio de la transcripción génica.[45]

1.3.2 Estructura y función

Un típico promotor basal abarca secuencias de ADN entre aproximadamente -40 y +50 relativos al sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés). Los elementos del promotor principal (i) interactúan con el complejo proteico pre-iniciación que contiene la ARN Polimerasa II; (ii) posicionan el sitio de inicio de la transcripción y controlan la dirección de la misma; y (iii) responde a los activadores y represores cercanos o distantes dentro de una célula. [46] Existen tres diferentes ARN polimerasas, de las cuales al ARN Polimerasa II se encarga de transcribir los genes que codifican proteínas.

1.3.3 Importancia de los promotores dentro de la ingeniería genética de plantas.

En la ingeniería genética los promotores son los responsables de la expresión de los genes determinando el nivel de transcripción. Los promotores comúnmente usados en ingeniería genética en plantas incluyen virus, bacterias, y plantas. Los promotores, de acuerdo a la manera de cómo dirigen la transcripción pueden ser clasificados en tres grupos grandes:

- I. Promotores constitutivos: son aquellos que continuamente transcriben genes, tienen gran afinidad con la ARN polimerasa y factores de transcripciones basales. Esta categoría de promotores es utilizada mayormente en la expresión de agentes selectivos para transgénicos o para expresión de genes transgénicos o para expresión de genes en donde la proteína producida se la necesite en cantidades considerables y en todos los tejidos y estados fisiológicos de la planta. . Un promotor constitutivo ampliamente usado se deriva del virus del mosaico de la coliflor el cuál es el CaMV 35S.
- II. Promotores de tejido específico o de regulación de acuerdo al desarrollo fisiológico: algunos genes solo se expresan en ciertos tejidos específicos como en las hojas o sólo en las raíces. Asimismo, algunos promotores solo se activan en determinados estados fisiológicos o de desarrollo de la planta como en estado de plántulas, o en plantas en floración

III. Promotores inducibles: algunos promotores están activos frente a la respuesta a un determinado estrés que puede ser biótico (ataque de patógenos) o abiótico (bajas o altas temperaturas, suelos salinos, sequía). Por ejemplo, promotores inducidos por heridas han sido aislados de especies como el arroz.[47]

1.3.4 Análisis de actividad de promotores mediante el uso de genes reporteros

Además de estudios *in situ* a través de (q)RT-PCR, Northern blots o micro arreglos, donde indirectamente se puede determinar la función de los promotores analizando la expresión de los genes, la actividad de los promotores se puede determinar mediante genes reporteros. La región de control regula la transcripción de un gen reportero como la β -glucuronidasa (*uidA*, GUS) o la luciferasa (*luc*), que pueden ser medidos fácilmente a través de la proteína producida por la expresión.

Para realizar el análisis de promotores con genes reporteros es necesaria la transformación temporal o

estable de células o plantas para realizar los ensayos. Generalmente los plásmidos usados para transformar contienen el gen reportero con el promotor a evaluar y un gen de selección expresado por un promotor constitutivo (por ejemplo el pCAMBIA1301, www.cambia.org) en el caso de la transformación estable. Genes selectivos como el de resistencia a higromicina se utilizan para la selección de los eventos transgénicos permitiendo que crezcan las células o plantas transformadas que en un medio que contiene higromicina, por lo que las que no están transformadas se mueren [46].

El gen GUS es usado frecuentemente como gen reportero para el análisis de promotores. Se ha utilizado para identificar elementos involucrados en la regulación de expresión de genes en diferentes niveles como regulación de tejido específico, hormonal y respuesta al estrés. Este gen reportero puede ser analizado con los análisis histoquímico y fluorométrico [48]. La cuantificación fluorométrica de 4-methylumbeliferone, producida por un precursor de glucuronido permite analizar la actividad del GUS en extractos de tejidos. Por otro lado un análisis histoquímico permite localizar

exactamente la actividad del gen GUS mediante el uso del sustrato X-GLUC.[49]

1.3.5 Promotores de banano

Asimismo, múltiples promotores han sido utilizados en transformación genética temporal o estable de banano, la mayoría siendo heterólogos. Promotores de virus incluyendo el CaMV 35S y sus modificaciones han sido extensivamente utilizados proveyendo expresión alta y constitutiva. A excepción de los promotores de maíz de ubiquitina y de actina de arroz, pocos promotores de plantas han sido utilizados en la transformación genética de banano. La expresión de diferentes promotores ha sido investigada en banano, en estos se obtuvieron que el gen ubiquitina de maíz (*ubi1*) es el promotor con mayor expresión, seguido del gen actina del arroz (*act1D*) y finalmente el promotor recombinante Emu [44]. Pocos promotores nativos de banano han sido utilizados en la transformación de banano que incluye el promotor de actina y de promotores de genes involucrados en el desarrollo del fruto. [44]

CAPÍTULO 2

2. Metodología

2.1 Caracterización actividad de promotores de banano

2.1.1 Material vegetal

Se utilizaron suspensiones de células embriogénicas (SCE) de banano variedad 'Williams' (AAA), código W047P2, provistas por el laboratorio de cultivo de tejidos del CIBE-ESPOL (Sofía Korneva comunicación personal).

2.1.2 Diseño experimental

La cantidad de muestras por tratamiento varió según la presión de selección (APENDICE A). Se utilizaron 21 unidades muestrales (la unidad de muestra se definió como una malla de poliéster de 50 μ m de porosidad y de 2cm² de área en donde se colocó aproximadamente 50 mg de peso fresco de células embriogénicas) para cada uno de los tratamientos pCAMBIA1301, pCAMBIA1391z, pESKUL 1 y pESKUL 7 bajo presión de selección Higromicina (Hy) 12.5 μ g/ml. Por otro lado se utilizaron nueve unidades muestrales para cada uno de los tratamientos (plásmidos) pCAMBIA1301 y pCAMBIA1391z bajo presión de selección 18 μ g/ml. Adicionalmente se utilizaron nueve unidades muestrales de cada uno de los tratamientos pCAMBIA1301, pCAMBIA1391z, pESKUL 1 y pESKUL 7 sin ningún agente selectivo. (sección 3.1.3, detalle de los plásmidos utilizados) .

Finalmente se definió como control a aquellas unidades muestrales que no fueron transformadas genéticamente. Estas, sin embargo, fueron sometidas

a niveles de presión de selección y se emplearon tres unidades muestrales para cada nivel de agente selectivo higromicina 12.5 $\mu\text{g/ml}$ y 18 $\mu\text{g/ml}$. Como control absoluto del experimento se emplearon 21 unidades muestrales que no fueron sometidas a ningún tipo de tratamiento o agente selectivo.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA) [50].

Debido a la naturaleza de los datos, (paramétricos), se utilizó la *prueba de rangos múltiples de Duncan*, para determinar diferencias significativas entre tratamientos, las variables dependientes y su variable de clasificación. (Tabla 1). Se escogió la prueba de Duncan debido a que esta permite la comparación de todos los posibles pares de medidas de tratamientos.[51]

TABLA 1
TIPO DE ANÁLISIS, VARIABLES DEPENDIENTE Y
DE CLASIFICACIÓN DEL EXPERIMENTO.

| Análisis | Variable dependiente | Variable de clasificación |
|------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <i>Eficiencia de transformación</i> | Número de colonias sobrevivientes. | Dosis de antibiótico Higromicina (0µg/ml, 12.5 µg/ml y 18 µg/ml). |
| <i>Actividad del promotor (histoquímica)</i> | Número de puntos azules | Tipos de promotores |
| <i>Actividad del promotor (fluorométrica)</i> | Medición fluorométrica | Tipos de promotores |

2.1.3 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Para la transformación mediada por *Agrobacterium* se utilizó el protocolo base de Pérez-Hernández [52], estandarizado para el CIBE (APENDICE B). La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 se usó conteniendo los diferentes plásmidos (Figura. 2.1). Los plásmidos utilizados fueron el pCAMBIA1301 (www.cambia.org) que contiene el promotor 35S del virus de mosaico de la coliflor (CaMV) dirigiendo la expresión del gen reportero *uidA*^{INT}. El gen de selección de resistencia a higromicina es expresado por el promotor aumentado del 35S. Los plásmidos pESKUL1 y pESKUL7 son idénticos al pCAMBIA1301 a diferencia de que se utilizan los promotores de banano 17-1 y 85-1 aislados de la variedad 'Three Hand Planty' para expresar el gen reportero *uidA*^{INT}.

[44]

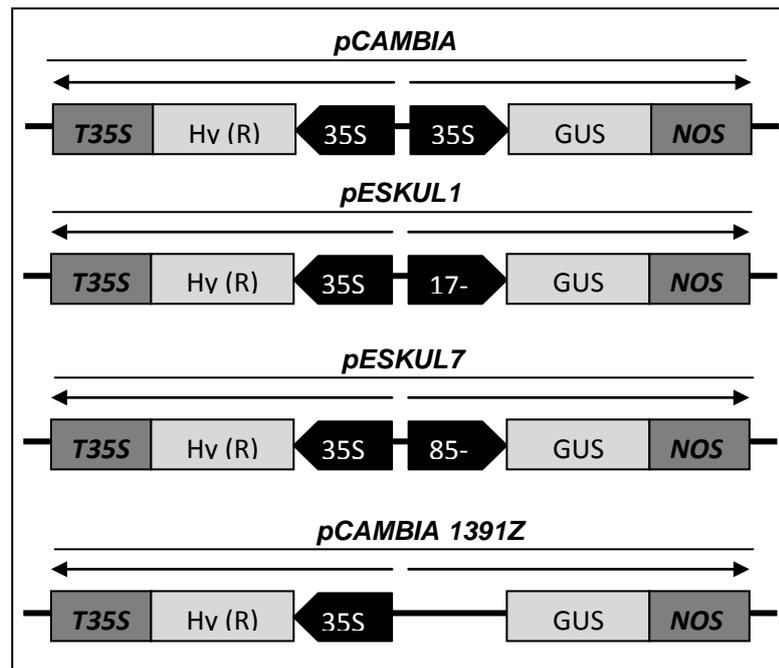


FIGURA 2.1 ESQUEMA DE LOS PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO. 35S: Promotor del virus del mosaico de la coliflor CMV por sus siglas en ingles. 17-1 y 85-1 Promotores de la variedad de *Musa* 'Three Hand Planty'. Gen reportero GUS, gene *uidA*^{INT}. NOS: terminador Nos. HY(R): gen de resistencia a la higromicina. T35S: terminador del virus del mosaico de la coliflor CMV.

FUENTE: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Laboratorio de Biología Molecular, generado por Lisette Hidalgo.

2.1.4. Tratamientos. Concentración de agente de selección

Para determinar la eficiencia de la transformación se utilizaron como variables independientes dos diferentes dosis de higromicina: 12,5 y 18 $\mu\text{g/ml}$, usando como control el medio de cultivo libre de antibiótico.

Con el fin de determinar la eficiencia de los promotores de banano, se tomaron como variables independientes: 35S del CaMV, 17-1 y 85-1 de la variedad de banano 'Three Hand Planty'. Adicionalmente se utilizó un control sin promotor (pCAMBIA1391z). Como variable dependiente se utilizó la expresión temporal del gen reportero GUS (sección 2.1.6).

2.1.5. Estimación de colonias de células embriogénicas sobrevivientes

Mediante el uso de un estereoscopio se realizó el conteo de las colonias sobrevivientes de células

embriogénicas transformadas observadas, posterior a 10 semanas de selección en medio ZZ, con agente selectivo Higromicina a las diferentes concentraciones (0 µg/ml, 12.5 µg/ml y 18 µg/ml).

Se realizó un cálculo de porcentaje de células sobrevivientes. Se definió a la media de colonias sobrevivientes en medio ZZ sin agente selectivo (Hy 0 µg/ml), como el 100% de posibles células sobrevivientes. Se comparó con las colonias sobrevivientes que se sometieron bajo agente selectivo.

2.1.6 Determinación de la actividad de promotores mediante la expresión del gen *uidA^{INT}*

La actividad del gen fue medida con análisis de fluorometría y análisis histoquímico, a los 7 días, 11 semanas y 29 semanas posteriores a la transformación.

Para el análisis fluorométrico, se tomó aproximadamente 100 mg de células embriogénicas transformadas para el ensayo fluorométrico, el cual se

desarrolló para medir la actividad enzimática del gen GUS [48] usando el protocolo modificado por Santos Ordoñez (APENDICE C). La expresión del gen se estimó mediante la cuantificación de proteínas totales y la cuantificación fluorométrica de 4-methylumbeliferone, medida con un fluorómetro *Synergy HT* marca Biotek. La longitud de onda para la medición de proteínas fue de 595nm; finalmente el parámetro fluorométrico fue medido como excitación 360/40 y detección 460/40.

Por otro lado, para el ensayo histoquímico se tomó muestra fresca y se incubó a 37°C con el sustrato X-GLUC (APENDICE D). La expresión del gen se vio representada mediante la tinción azul de las colonias de células de banano. El conteo de estos puntos se realizó con un estereoscopio y un contador de colonias; las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Cybershot marca Sony.

2.1.7 Determinación molecular de líneas modificadas de células embriogénicas de banano

Para determinar la presencia del ADN-T en el genoma de las muestras transformadas se realizó una extracción de ADN de las muestras pCAMBIA1391z, pESKUL1 y pESKUL7 en la semana 29. Se siguió el protocolo de extracción de ADN, desarrollado internamente por el CIBE. Posterior al aislamiento de ADN, se separaron las muestras en un gel de agarosa al 1% de concentración y SYBRsafe 1x marca Invitrogen, colocando 6 µl de cada una de las muestras en los pocillos del gel. Las condiciones de electroforesis fueron 100 voltios durante 20 minutos.

Luego de confirmar la presencia de ADN, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés. Se utilizaron primers o iniciadores que se anillan con el gen reportero GUS (*uidA*^{INT}) y en los respectivos promotores (17-1, 35S y 85-1). (APENDICE E)

2.1.8 Análisis bioinformático de promotores de banano

Las secuencias de promotores de banano se analizaron mediante el uso de los programas PlantCARE

(bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html;
Lescot *et al.*, 2002) y PLACE
(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>; Higo *et al.* 1999). Por
otro lado, para determinar la presencia de promotores en
las secuencias se utilizó el programa TSSP
(www.softberry.com)

2.2 Interacción *Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*

2.2.1 Diseño experimental

Bajo condiciones de invernadero se utilizó un diseño completamente al azar, donde plantas de banano fueron inoculadas artificialmente con el hongo *Mycosphaerella fijiensis* [53]

Se utilizó el análisis estadístico ANOVA con prueba de contraste Tuckey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Las comparaciones se realizaron entre el número de estomas penetrados por variedad,

Las muestras fueron recolectadas los días 2, 4 y 6 posterior a la inoculación (dpi). El promedio de temperatura durante la mañana fue de 22°C.

2.2.2 Variedades de banano

Las variedades de banano analizadas fueron 'Williams' (susceptible a la Sigatoka negra), 'Tuu Gia' (resistente) y 'Calcutta-4 (resistente)'. Se utilizaron plantas con altura aproximada de 25cm y cada una poseía al menos 3 hojas.

2.2.3 Tratamientos

Se utilizaron un total de 36 plantas de banano de diferentes variedades. Cada una de las variedades poseía un total de 12 plantas. Las variedades usadas fueron: 'Williams' (genotipo AAA), 'Calcutta-4' (AA) y 'Tuu Gia' (AA), las cuales fueron separadas en 3 tratamientos:

- Control: plantas no inoculadas.
- Control gelatina: plantas rociadas con suspensión de gelatina al 3% sin *M. fijiensis*.
- Inoculadas: plantas inoculadas con conidias de *M. fijiensis* suspendidas en gelatina al 3%, la cepa fue originaria de Vines y la concentración usada fue de 11.5×10^3 conidios/ml. El aislamiento se realizó en base al método de obtención de conidios, desarrollado en interno por el CIBE.

Con la ayuda de un aerógrafo se inoculó rociando la hoja 3, específicamente en el envés de la misma, debido a que es en esta parte donde existe más cantidad de estomas.



FIGURA 5.2 INOCULACIÓN ARTIFICIAL. Se observa la hoja 3 del cultivar 'Williams' (AAA) con conidias de *Micosphaerella fijiensis* suspendidas en solución de gelatina al 3% a una concentración de 11.5×10^3 c/ml

FUENTE: foto tomada por Lisette Hidalgo en el invernadero del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador.

Finalizada la inoculación se colocó una caja protectora de plástico para evitar contaminación entre tratamientos.

2.2.4 Conteo de estomas penetrados

2.2.4.1 Preparación de muestras

Las muestras recolectadas se colocaron dentro de cajas para cortes histológicos Tissue Tek. Se eliminó

la clorofila sumergiendo las muestras en solución de hidróxido de potasio 1 M, exponiéndolas a 70°C durante 30 minutos. Se realizaron tres lavados con agua destilada.



FIGURA 2.6 SOLUCIÓN DE DECOLORACIÓN.

Muestras sumergidas en solución de decoloración hidróxido de potasio 1M.

FUENTE: Foto tomada por Lisette Hidalgo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Laboratorio de Biología Molecular.

La solución para la tinción utilizó 25mg de anilina azul en 50ml de K_2HPO_4 . Las muestras fueron trasladadas a tubos de capacidad de 2 ml, donde se adicionó 1ml de la solución de tinción y se aplicó 600mmHg de presión al vacío durante 2 horas.



FIGURA 2.7 TINCIÓN AL VACÍO DE MUESTRAS INOCULADAS ARTIFICIALMENTE CON *M. FIJENSIS*. *Proceso de tinción con bomba de vacío y anilina azul.*

FUENTE: Foto tomada por Lisette Hidalgo en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Laboratorio de Biología Molecular.

2.2.4.2 Conteo

Se observaron las muestras teñidas en un microscopio óptico a 40x; el área de observación fue de 2cm². Se realizó el conteo de estomas penetrados con la ayuda de un contador de colonias. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Cybershot marca Sony.

CAPÍTULO 3

3 Resultados y discusión

3.2 Caracterización de actividad de promotores

3.1.1 Eficiencia de transformación bajo diferentes concentraciones del agente selectivo

Existieron diferencias significativas entre los tratamientos de agente selectivo higromicina presente en los medios de cultivo con las concentraciones 12.5 y 18 $\mu\text{g/ml}$, siendo la concentración más alta aquella que posee menos células

embriogénicas sobrevivientes comparadas con el control
(Figura 3.1)

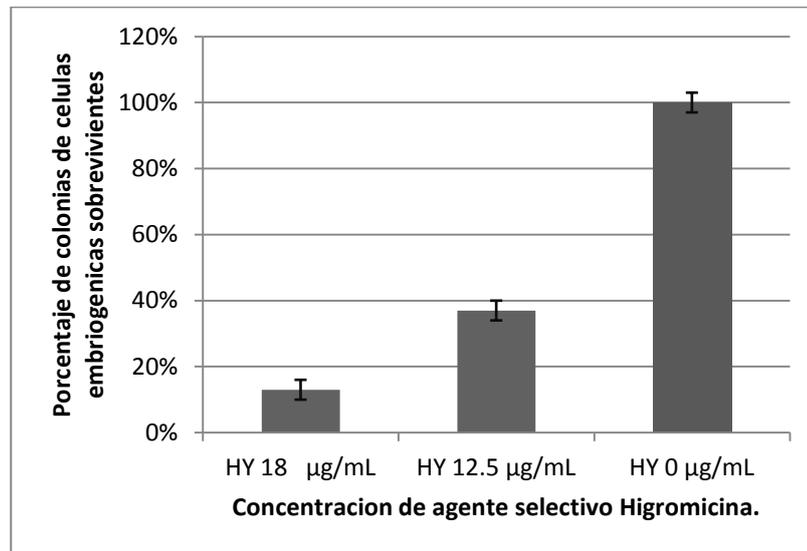


FIGURA 3.1 PORCENTAJE DE COLONIAS DE CELULAS EMBRIOGENICAS SOBREVIVIENTES. Las barras indican el porcentaje de colonias sobrevivientes, de células embriogénicas con resistencia a la higromicina, posterior a un periodo de selección de 10 semanas en medio de cultivo con agente selectivo Higromicina, con concentraciones 0 µg/ml, 12.5 µg/ml y 18 µg/ml. E.E=0.03.

Debido a que las células transformadas poseen integrado el gen de resistencia a la higromicina, la concentración de antibiótico a 18 $\mu\text{g/ml}$ limita el crecimiento de aquellas células embriogénicas no transformadas o que el nivel de expresión del gen de resistencia no sea suficiente para que las células sobrevivan, dando como resultado una selección efectiva mediante el uso de esta concentración.

Por otra parte, se realizó la revisión bibliográfica de estudios del efecto de la higromicina con otras especies. Como lo es el caso de la especie *Brassica juncea* (mostaza negra) la misma que fue sometida con diferentes concentraciones de higromicina (0, 5, 10, 15, 20 y 30 $\mu\text{g/ml}$). En consecuencia, la regeneración de las plantas fue inhibida por el incremento de la concentración. Solo el 8.3% de los explantes regeneraron en presencia de 15 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina y ningún explante regeneró a partir de la concentración 20 $\mu\text{g/ml}$, el promotor utilizado para la expresión del gen de resistencia a la higromicina fue el 35S[54].

La selección de tejidos transgénicos posterior a la transformación es el paso clave para la recuperación total de

plantas transgénicas. El gen de resistencia a la higromicina ha sido usado como un agente selectivo eficiente en varios métodos de transformación de diferentes cultivos, sin generar problemas en la fertilidad de la planta [55]. La higromicina ha sido utilizada como agente selectivo en varios cultivos transgénicos como el arroz, maíz, palma, entre otros, donde las concentraciones varían de 40 a 80 $\mu\text{g/ml}$. [56] Pero la estandarización del protocolo de transformación de Sánchez [57] indica que las concentraciones adecuadas para células embriogénicas de banano de Ecuador varían de 12.5 a 18 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, estos resultados reflejan que un menor número de colonias sobreviven a concentración de higromicina a 18 $\mu\text{g/ml}$ donde existen un mayor número de células transformadas. En contraste, la concentración 12.5 $\mu\text{g/ml}$ muestra un mayor número de colonias sobrevivientes, pero no todas estas colonias se encuentran transformadas. La utilización de la concentración 12.5 logra evitar el riesgo de un alto índice de mortalidad.

3.1.2 Análisis de la actividad de los promotores de banano

La actividad de los promotores fue medida a través de la expresión del gen reportero GUS mediante dos análisis

diferentes, ensayo histoquímico y ensayo fluorométrico, donde se evaluaron a los promotores bajo el efecto del gen selectivo.

Posterior a la semana de transformación el análisis histoquímico reveló un bajo número de colonias teñidas de azul. El índigo azul representa la expresión del gen, la misma que fue baja en todos los tratamientos (pCAMBIA1301, pESKUL1 y pESKUL7) debido a la poca cantidad de células transformadas. (Figuras. 3.2 y 3.3). Sin embargo, esta primera evaluación indicó una tendencia del comportamiento de los promotores, pues el más efectivo fue 35S (pCAMBIA1301). No se detectaron puntos azules en los controles sin transformar ni en las células transformadas con el vector pCAMBIA1391z (Fig. 3.4), el cual no posee promotor en la región 5' del gen reportero GUS.

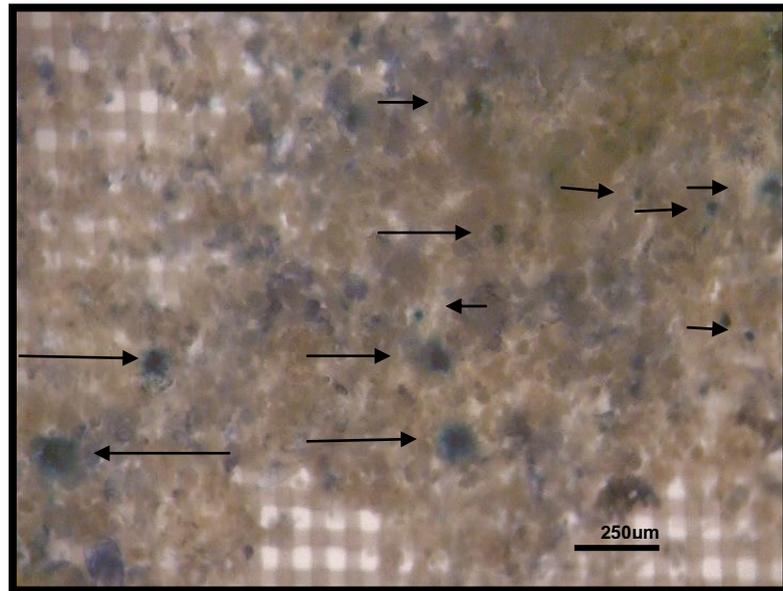


FIGURA 3.2 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301.

Células embriogénicas después de siete días de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, plásmido pCAMBIA1301. Las células fueron mantenidas con el sustrato X-GLUC durante 14 horas a 37°C. Las flechas indican el índigo azul, producto de la expresión de gen reportero GUS. La barra negra representa 250µm

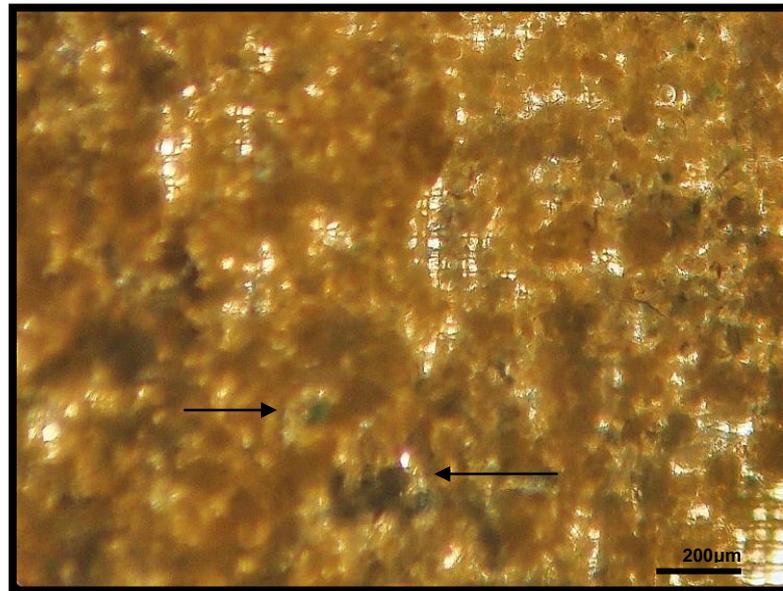


FIGURA 3.3 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO PESKUL7. Células embriogénicas luego de siete días de ser transformadas con *Agrobacterium tumefaciens*, plásmido pESKUL7. Las células se mantuvieron con el sustrato X-GLUC durante 14 horas a 37°C. Las flechas indican el índigo azul, producto de la expresión de gen reportero GUS. La barra negra representa 350µm.

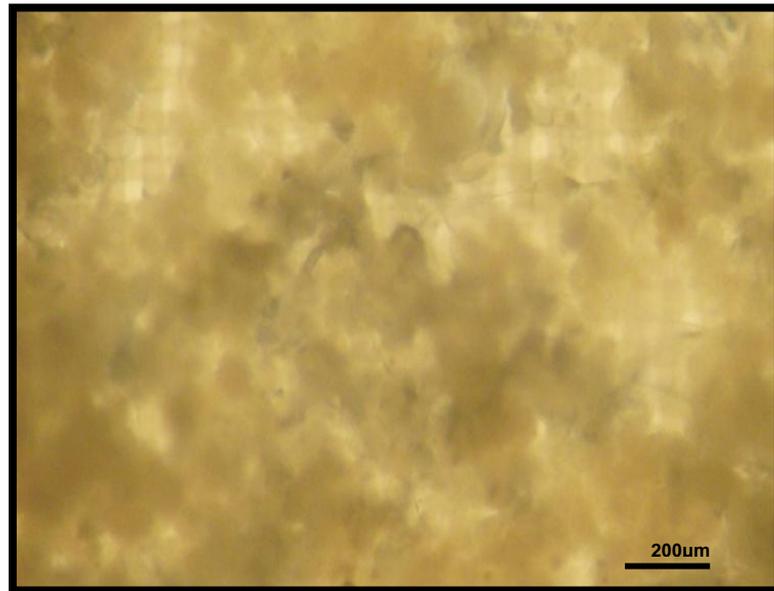


FIGURA 3.4 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO SIN TRANSFORMAR Células embriogénicas siete días después de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, plásmido pCAMBIA1391z. Las células fueron mantenidas con el sustrato X-GLUC durante 14 horas a 37°C. La barra negra representa 200µm. Se evidencia la ausencia de puntos azules.

Por otro lado, al transcurrir las 10 semanas de selección en higromicina, el análisis histoquímico reflejó la existencia de diferencias significativas, entre la expresión del gen reportero GUS de los diferentes promotores. (Tabla 2)

TABLA 2
PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN POR
TRATAMIENTO.

Cada letra diferente indica diferencias significativas ($P \leq 0.05$). La media representa la frecuencia de los valores donde el valor de 1 representa al 100% de presencia de puntos azules por tratamiento, resultado de la prueba histoquímica luego de 10 semanas de selección en higromicina (Hy 0 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ y 18 $\mu\text{g/ml}$).

Test: Duncan Alfa=0.05

Error: 0.0772 gl: 693

| <i>PLASMIDO</i> | <i>Medias</i> | <i>n</i> | <i>E.E.</i> |
|------------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
|------------------------|----------------------|-----------------|--------------------|

| | | | | |
|---------------------------------------------------------|------|-----|------|---|
| <i>pESKUL 1 Hy 0µg/ml</i> | 0 | 100 | 0.03 | A |
| <i>pESKUL 7 Hy 0µg/ml</i> | 0.02 | 100 | 0.03 | A |
| <i>pESKUL 1 HyHy12,5</i> <i>µg/ml</i> | 0.02 | 100 | 0.03 | A |
| <i>pCAMBIA1301 HyHy</i> <i>0µg/ml</i> | 0.14 | 100 | 0.03 | B |
| <i>pESKUL7 Hy12,5</i> <i>µg/ml</i> | 0.15 | 100 | 0.03 | B |
| <i>pCAMBIA1301 Hy12,5</i> <i>µg/ml</i> | 0.85 | 100 | 0.03 | C |
| <i>pCAMBIA1301 Hy18</i> <i>µg/ml</i> | 0.86 | 100 | 0.03 | C |

No existieron diferencias significativas entre la expresión de gen GUS de los promotores pESKUL1, pESKUL7 bajo ningún agente de selección y el promotor pESKUL1 con agente de selección Hy 12.5 µg/ml, mostrando el menor número de puntos azules. La ausencia de agente selectivo permite el crecimiento de células no transformadas de manera desmedida. Consecuentemente la proporción de células transformadas fue menor, este resultado se reflejó mediante el número de puntos azules. Por otro lado, bajo una presión de selección de Hy 12.5 µg/ml, el plásmido

pESKUL1 mostró una baja expresión del gen, reflejada en el número de puntos azules, indicando su baja actividad como promotor [41]. Otros estudios realizados en banano con pESKUL1 indican una baja actividad en comparación con promotor de la ubiquitina del maíz [58].

Por otro lado, la presencia de un mayor número de puntos azules se encontró en las muestras transformadas con los plásmidos pCAMBIA1301 (promotor 35S) y pESKUL7 (promotor de banano 85-1, sin y con agente selectivo (Hy 12.5 µg/ml); los mismos que al ser comparados mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan no demostraron tener diferencias significativas. A pesar de no poseer un agente selectivo el pCAMBIA1301 demuestra ser un buen promotor de la expresión del gen (Figura 3.5), seguido de pESKUL7 bajo presión de selección.

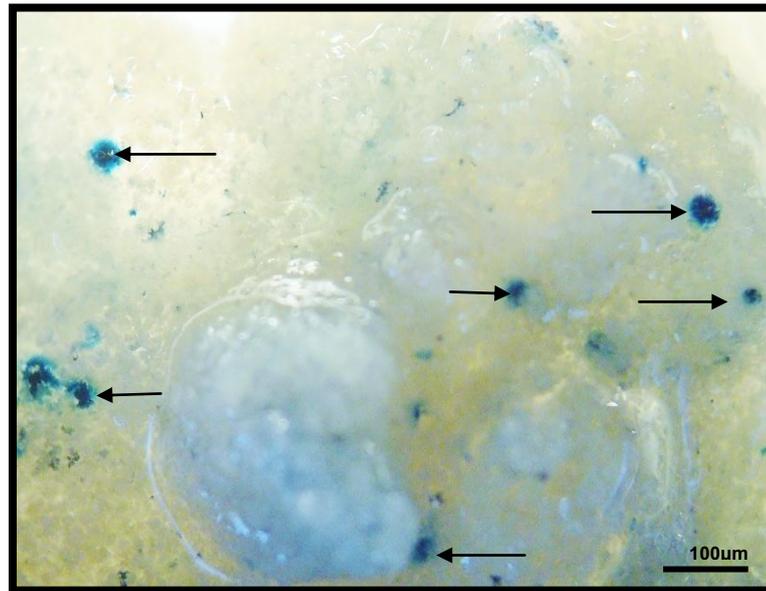


FIGURA 3.5 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN COLONIAS DE CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301 EN SELECCIÓN CON HIGROMICINA (0 $\mu\text{g/ml}$). Colonias de células embriogénicas transformadas con *Agrobacterium tumefaciens*, plásmido pCAMBIA1301. Ensayo histoquímico posterior a 10 semanas en medio de selección (Higromicina 0 $\mu\text{g/ml}$). Las células fueron incubadas en presencia de X-GLUCX-GLUC durante 14 horas a 37°C. Las flechas indican el índigo azul, producto de la expresión de gen reportero GUS. La barra negra representa 100 μm .

Finalmente los promotores con mayor número de puntos azules bajo condición de presión de selección con higromicina fueron pCAMBIA1301 con Hy 12.5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3.6) y pCAMBIA1301 con Hy 18 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3.7). La diferencia con respecto a los otros promotores bajo diferentes condiciones fue estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

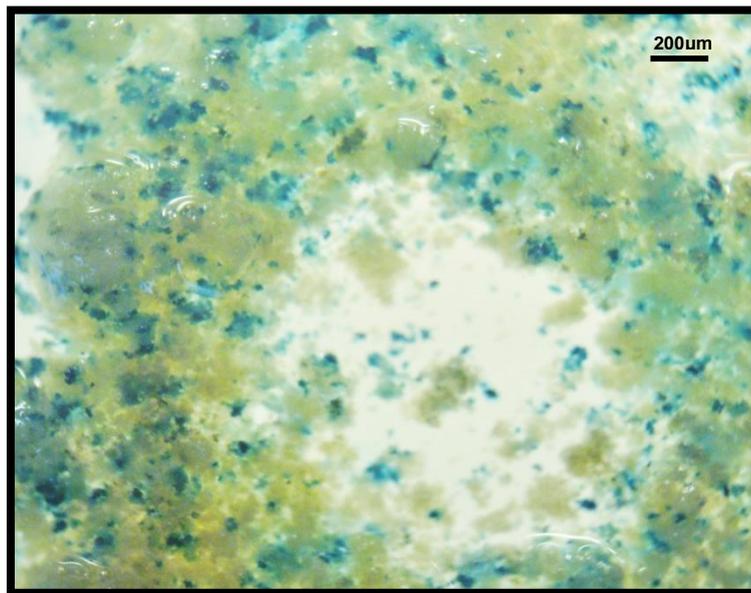


FIGURA 3.6 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN COLONIAS DE CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301 EN SELECCIÓN CON HIGROMICINA (12.5 $\mu\text{g/ml}$) Colonias de células embriogénicas transformadas con *Agrobacterium*

tumefaciens, plásmido pCAMBIA1301. Ensayo histoquímico posterior a 10 semanas en medio de selección (Higromicina 12.5 $\mu\text{g/ml}$). Las células fueron incubadas en presencia de X-GLUC durante 14 horas a 37°C. El índigo azul es producto de la expresión de gen reportero GUS. La barra negra representa 200 μm .

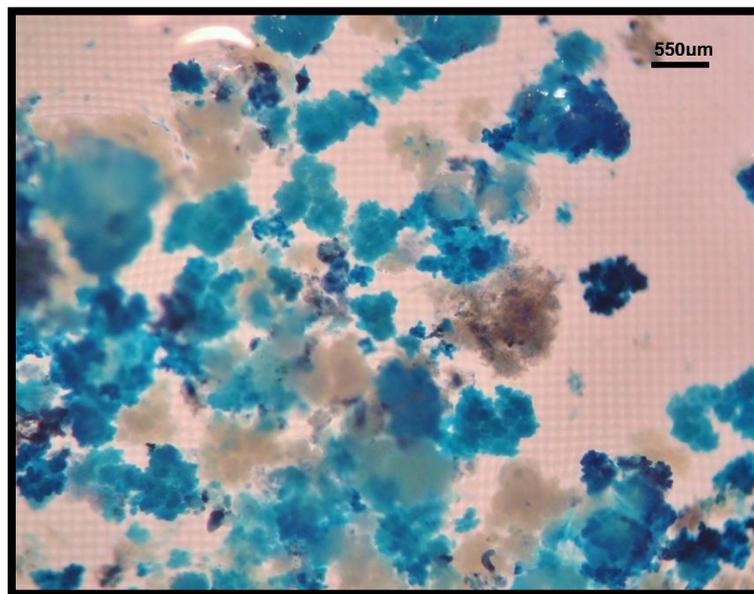


FIGURA 3.7 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN COLONIAS DE CELULAS EMBRIOGÉNICAS DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301 EN SELECCIÓN CON HIGROMICINA (18 $\mu\text{g/ml}$) Colonias de células embriogénicas transformadas con *Agrobacterium tumefaciens*, plásmido pCAMBIA1301. Ensayo histoquímico

posterior a 10 semanas en medio de selección (Higromicina 18 $\mu\text{g/ml}$). Las colonias de células fueron incubadas en presencia de X-GLUC durante 14 horas a 37°C. El índigo azul es producto de la expresión de gen reportero GUS. La barra negra representa 550 μm .

La expresión del promotor 35S en el análisis histoquímico indicó que es un promotor útil para la expresión de un gen. Además con la optimización del agente selectivo higromicina en concentración Hy 18 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvieron un mayor número de puntos azules indicando un mayor número de líneas modificadas genéticamente (Figura 3.8).

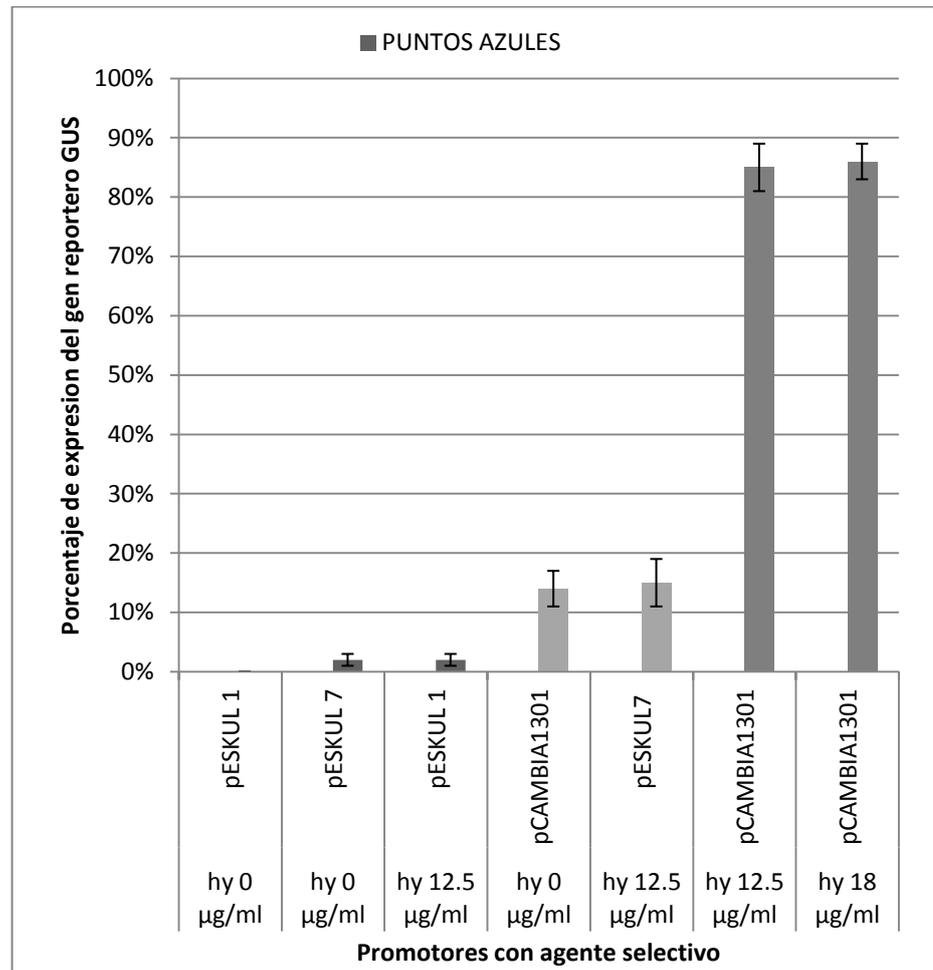


FIGURA 3.8 PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO GUS. Fue calculado con respecto al número de colonias obtenidas de color azul, posterior a la aplicación del sustrato X-GLUC. Se utilizaron tres unidades muestrales por tratamiento posterior a la etapa de selección. Los promotores se identifican por el nombre del plásmido pESKUL1 (promotor17-1), pESKUL7 (promotor85-1) y pCAMBIA1301 (promotor 35S) y se indica las condiciones de

agente selectivo (higromicina 0µg/ml, 12.5µg/ml y 18µg/ml) a las que fueron expuestas.

La comparación de los resultados del análisis fluorométrico demostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre la expresión del gen GUS en los tratamientos pCAMBIA1301control, con higromicina Hy12.5 µg/ml y 18 µg/ml en diferentes etapas del tiempo.(Figura 3.9) (APENDICE F)

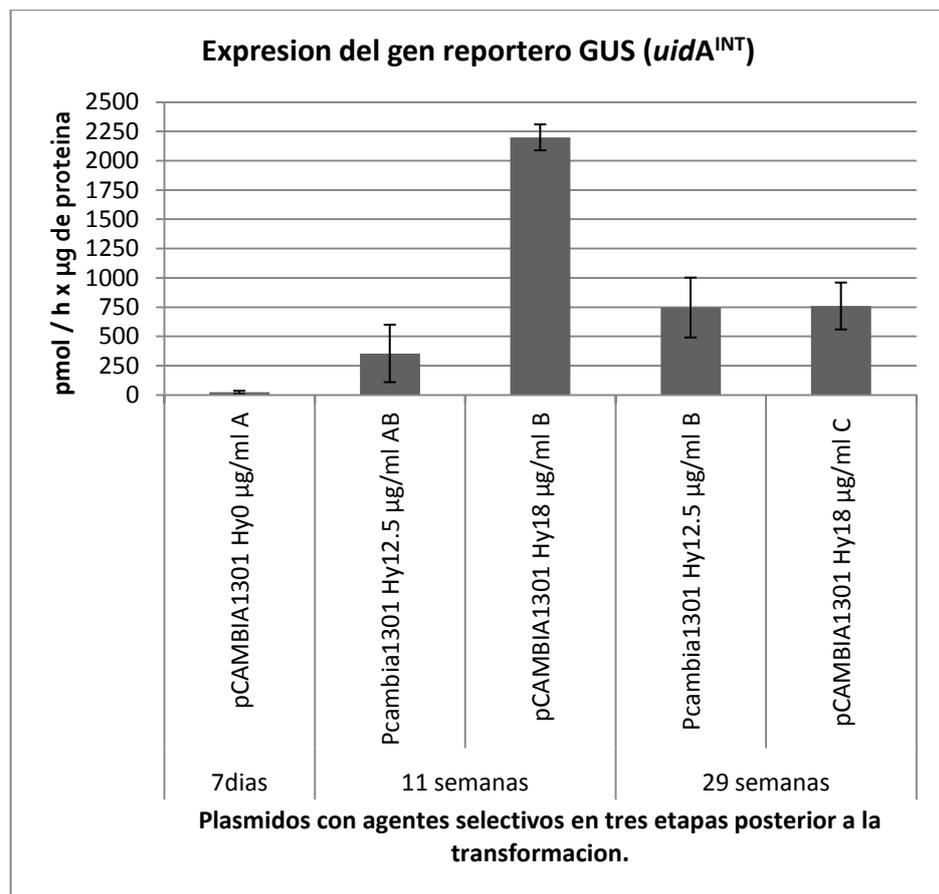


FIGURA 3.9 EXPRESIÓN DEL GEN REPORTERO GUS (*UIDA^{INT}*), CALCULADO POR MEDIO DEL ANÁLISIS

FLUOROMÉTRICO. Se utilizaron tres unidades muestrales por tratamiento. Los promotores se identifican por el nombre del plásmido pESKUL1 (promotor17-1), pESKUL7 (promotor85-1) y pCAMBIA1301 (promotor 35S); además se indica las condiciones de agente selectivo (higromicina 0µg/ml, 12.5µg/ml y 18µg/ml) en diferentes etapas del tiempo: 7 días, 11 semanas y 29 semanas después de la transformación de las células embriogénicas con *Agrobacterium tumefaciens*. Letras diferentes (A, B y C) indican diferencias significativas y letras similares indican falta de diferencias significativas, según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

No existieron diferencias significativas entre la expresión del gen posterior a los 7 días de la transformación y la expresión del gen posterior a 10 semanas de selección con higromicina Hy12.5 µg/ml.

El tratamiento pCAMBIA1301 bajo selección de Hy 18 µg/ml durante 10 semanas dio el nivel de expresión del GUS más alto. Cabe recalcar que en esta etapa las muestras son colonias de células. Estas se diferencian de las muestras de Hy 18 µg/ml a los

tres meses (Figura 3.10) en medio ITC-K, cuyas características son más sólidas y corresponden a las de un pequeño embriode.

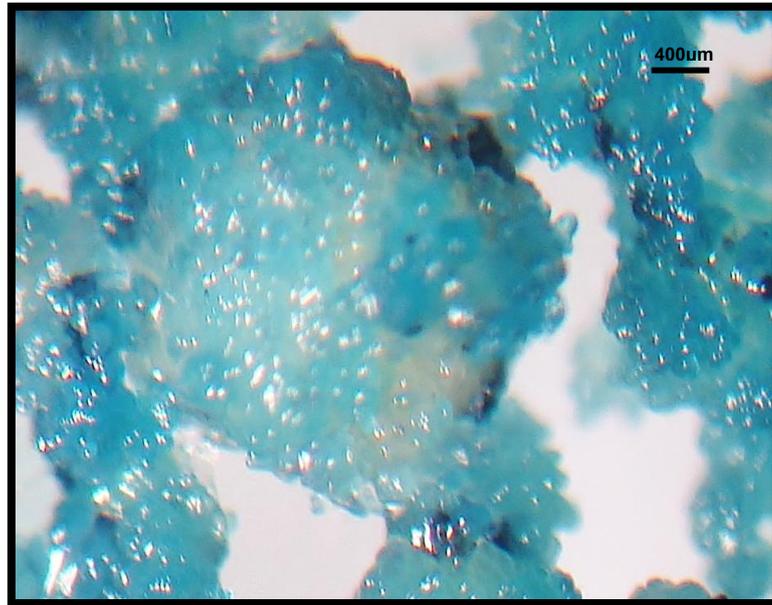


FIGURA 3.10 EXPRESION TEMPORAL DEL GEN GUS EN EMBRIODES DE BANANO TRANSFORMADAS CON EL PLÁSMIDO pCAMBIA1301 EN SELECCIÓN CON HIGROMICINA (18 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Embrioides observados después de 29 semanas de transformados con *Agrobacterium tumefaciens*, plásmido pCAMBIA1301. Fueron sometidos a 10 semanas de selección (Higromicina 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y luego trasladados a medio nutritivo ITC-K durante 18 semanas más. La muestra fue incubadas en presencia de X-GLUC durante 14 horas a 37°C. El índigo azul es producto de la expresión de gen reportero GUS. La barra negra representa 400 μm .

3.1.2.1 Determinación molecular de líneas modificadas de células embriogénicas de banano

Luego de la extracción de ADN se confirmó la presencia de ADN genómico. La PCR demostró la presencia del gen reportero GUS en el ADN genómico (Figura 3.11).

Asimismo, se detecto la presencia de los diferentes T-DNA de acuerdo a los plásmidos utilizados, excepto en los tratamientos que no se utilizaron agentes de selección (higromicina) indicando que las células no transformadas proliferaron y sobrepoblaron en comparación con las transformadas.

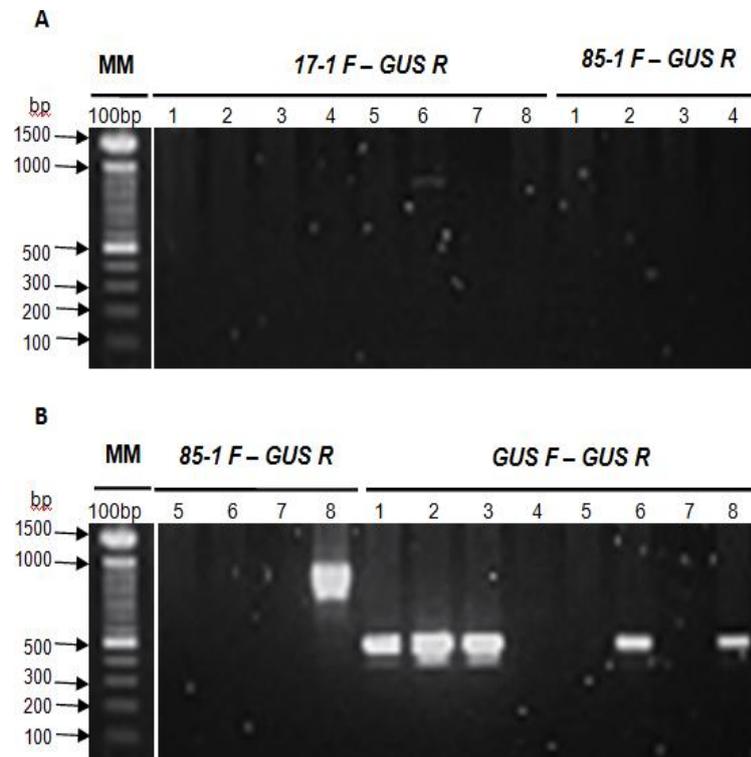


FIGURA 3.11 RESULTADO DE LA PCR. A. Se observa la presencia del promotor 17-1 con el gen reportero GUS, en la muestra 6. B. se observa la presencia del promotor 85-1 con el gen reportero GUS en la muestra 8. Además se observa la presencia del gen reportero GUS en las muestras 1, 2, 3, 6 y 8. El gel de agarosa al 1.8% fue sometido a 120 voltios durante 20 minutos en solución Tris-EDTA (TAE). Se utilizó un marcador molecular (MM) de 100bp marca Promega. El detalle de las muestras se describe en la TABLA 3.

TABLA 3
DESCRIPCIÓN DE MUESTRAS USADAS EN LA
PCR.

Las muestras fueron tomadas de cada tratamiento posterior a la etapa de 10 semanas en selección con higromicina (Hy 0 $\mu\text{g/ml}$, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ y 18 $\mu\text{g/ml}$).

| No. | Muestras |
|-----|-----------------------------------------|
| 1 | pCAMBIA 1301 (Hy12.5 $\mu\text{g/ml}$) |
| 2 | pCAMBIA 1301 (Hy18 $\mu\text{g/ml}$) |
| 3 | pCAMBIA 1391Z (Hy 0 $\mu\text{g/ml}$) |
| 4 | Agua |
| 5 | pESKUL1 (Hy 0 $\mu\text{g/ml}$) |
| 6 | pESKUL1 (Hy12.5 $\mu\text{g/ml}$) |
| 7 | pESKUL7 (Hy 0 $\mu\text{g/ml}$) |
| 8 | pESKUL (Hy12.5 $\mu\text{g/ml}$) |

3.1.3 Análisis Bioinformático

La secuencia de ADN de 1.75kb correspondiente al promotor 17-1, se encuentra disponible en la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante el código: EU161097. El análisis realizado con el software **Softberry** (APENDICE G), confirmó que la misma pertenece a la secuencia de un promotor. Además, se demostró la presencia de elementos y

factores de transcripción como los cis-acting elements (APENDICE H). Conjuntamente es importante señalar que este software no identificó la presencia de alguna caja TATA. Se señala el inicio de la transcripción en la posición 1233 y 431.

Por otro lado el promotor 85-1 analizado con el programa **Softberry** no demostró pertenecer a la secuencia de un promotor. Esto nos indica que el análisis bioinformático de secuencias no es 100% confiable, por lo tanto es necesario realizar pruebas para determinar su eficiencia.

Continuando con el análisis de la secuencia del promotor 17-1, el programa **Plant care**, detectó los cis-acting elements, el resultado demostró la presencia potencial de cajas TATA. Sin embargo, ninguna coincide con la región del punto inicial de la transcripción. Es posible reducir la cantidad de elementos no específicos o no funcionales mediante cortes para optimizar la funcionalidad del promotor. Ya que su secuencia es de 1.75kb, al ser larga la región 5' UTR del ARNm se pueden desarrollar dobles cadenas generando una traducción de proteínas deficiente o nula. Corroborando con

los resultados de los ensayos histoquímico esta puede ser la justificación a la baja expresión del gen reportero GUS con este promotor.

3.2 Interacción *Musa spp.*- *Mycosphaerella fijiensis*

3.2.1 Penetración del hongo a través de los estomas.

Se realizó un experimento piloto el cual reveló los días críticos en los cuales el hongo penetra a través del estoma, que fueron 2, 4 y 6 dpi. Adicionalmente se evaluaron las hojas 1, 2, y 3. El estado fisiológico en la hoja 3 posee un buen desarrollo de los estomas, que es la vía por donde el hongo ingresa; por esta característica fue seleccionada como hoja representativa para el conteo de estomas penetrados.

TABLA 4

TABLA 4

CONTEO DE ESTOMAS PENETRADOS DE PLANTAS

INOCULADAS CON *Mycosphaerella fijiensis*.

Numero de estomas penetrados, clasificados por variedad y dpi. Se realizaron observaciones en 3 cortes diferentes y se repitió el procedimiento una vez. La hoja 3 fue la utilizada para el conteo

| VARIEDAD | CORTE | OBSERVACION* | DIA 2 | DIA4 | DIA6 |
|-------------------|-------|--------------|-------|------|------|
| Williams | 1 | A | 0 | 0 | 0 |
| | 2 | | 0 | 0 | 0 |
| | 3 | | 0 | 4 | 0 |
| | 1 | B | 1 | 0 | 1 |
| | 2 | | 0 | 2 | 0 |
| | 3 | | 0 | 0 | 0 |
| Calcutta 4 | 1 | A | 0 | 0 | 2 |
| | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| | 3 | | 0 | 0 | 0 |
| | 1 | B | 0 | 2 | 2 |
| | 2 | | 1 | 1 | 1 |
| | 3 | | 2 | 1 | 0 |
| Tuu Gia | 1 | A | 0 | 0 | 1 |
| | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| | 3 | | 0 | 3 | 0 |
| | 1 | B | 0 | 1 | 0 |
| | | | | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2 | 0 | 0 | 2 |
| 3 | 0 | 0 | 3 |

3.2.2 Número de estomas penetrados por el hongo en variedades de *Musa* resistentes y susceptibles a la Sigatoka negra.

No existieron diferencias significativas entre el número de estomas penetrados en las diferentes variedades de banano evaluadas ('Williams', 'Calcutta' y 'Tuu Gia') (TABLA 5). Sin embargo, se observó que a medida que transcurrieron los días, el número de estomas penetrados incrementó. No obstante, la sintomatología no se presentó hasta 15 dpi.

TABLA 5

PRUEBA DE TUCKEY

Se utilizó la prueba estadística de Tuckey para determinar diferencias significativas entre la media de estomas penetrados por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Se registraron 3 días (día 2, 4 y 6). En ninguno se demostró diferencias significativas.

DIA 2

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.80617

Error: 0.2889 gl: 15

| VARIEDAD | Medias | n | E.E. | |
|-----------------|--------|---|------|---|
| TUU GIA | 0 | 6 | 0.22 | A |
| WILLIAMS | 0.17 | 6 | 0.22 | A |
| CALCUTTA | 0.5 | 6 | 0.22 | A |

DIA 4

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.92342

Error: 1.6444 gl: 15

| VARIEDAD | Medias | n | E.E. | |
|-----------------|--------|---|------|---|
| TUU GIA | 0.67 | 6 | 0.52 | A |
| CALCUTTA | 0.67 | 6 | 0.52 | A |
| WILLIAMS | 1 | 6 | 0.52 | A |

Se

DIA 6

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.32279

Error: 0.7778 gl: 15

| VARIEDAD | Medias | n | E.E. | |
|-----------------|--------|---|------|---|
| WILLIAMS | 0.17 | 6 | 0.36 | A |
| CALCUTTA | 1 | 6 | 0.36 | A |
| TUU GIA | 1.17 | 6 | 0.36 | A |

observaron en muchos casos las estructuras del hongo lejos de los estomas, pero en otros casos se observó claramente como el hongo se desarrollaba y lograba penetrar a través del estoma (FIGURA 3.12).

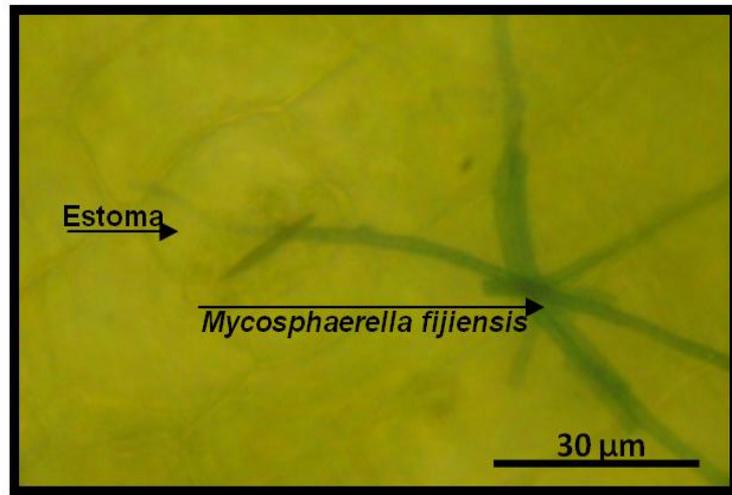


FIGURA 3.12 ESTOMA PENETRADO. Se observa la presencia de la estructura del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, y como esta ingresa a través del estoma de la hoja 3. La variedad de la planta es Williams y el día de evaluación fue el 4. La barra negra representa 30 μm .

La sintomatología presente en las plantas a los 30 dpi, correspondía a la enfermedad Sigatoka Negra. Es decir que se corroboró la existencia del hongo y el desarrollo exitoso de la enfermedad (FIGURA 3.13).

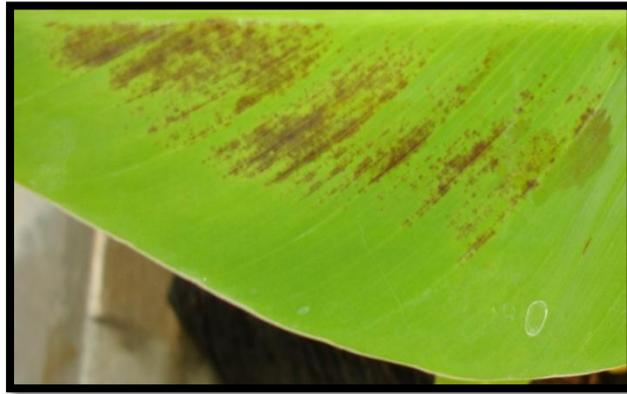


FIGURA 3.13 SINTOMATOLOGIA DE SIGATOKA NEGRA.

Se observa a la hoja 3 de la variedad Williams infectada con el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. La sintomatología se describe como presencia de estrías.

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Se demostraron diferencias significativas entre la actividad de los promotores usados, siendo de mayor a menor 35S >85-1 > 17-1.

La concentración de higromicina al 18 µg/ml resultó en la obtención de una mayor proporción de número de líneas modificadas genéticamente.

No existieron diferencias significativas entre el número de estomas penetrados por el hongo *M. fijiensis* en la variedades 'Williams', 'Calcutta' y 'Tuu Gia'

4.2 Recomendaciones

El promotor 85S puede seguir siendo evaluado en otras variedades de banano para la generación de cisgénicos, y el uso del promotor 35S se puede utilizar en el caso de que se requiera expresar en gran cantidad algún gen específico.

Se recomienda utilizar una concentración de 18 µg/ml del agente selectivo higromicina cuando se utilicen plásmidos que contenga el gen de resistencia a este antibiótico en transformaciones de banano.

Para el experimento de inoculación artificial con *M. fijiensis*, se recomienda utilizar concentraciones más altas de conidias en próximas evaluaciones.

APÉNDICES

APENDICE A

Modelo experimental

CODIGO SCE: W023P3B

| | 12,5 | 18 | (-) |
|----------------|-------------|-----------|------------|
| 1301 | 21 | 9 | 9 |
| 1391z | 21 | 9 | 9 |
| PESKUL1 | 21 | - | 9 |
| PESKUL7 | 21 | - | 9 |
| (-) | 3 | 3 | 21 |

El modelo queda de la siguiente forma:

Donde:

δ_1 = los plasmidos a utilizar

δ_2 = dosis de antibiótico a evaluar

δ_{12} = interaccion entre plasmidos y antibióticos

δ_3 = suspensiones embriogenicas

ϵ = error

APENDICE B

TRANSFORMACION DE SUSPENSION DE CELULAS DE BANANO

MEDIADA POR *AGROBACTERIUM*.

Stocks de bacterias: son almacenados a -80°C en 20% de glicerol, en medio con los antibióticos apropiados.

Sembrado: Aislar colonias puras en medio sólido selectivo (con antibióticos apropiados) YM.

| | |
|-----------------------------------------------------|----------|
| NaCl: | 0.1 g/L |
| MgSO ₄ •7H ₂ O: | 0.2 g/L |
| K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O: | 0.5 g/L |
| Yeast extract: | 0.4 g/L |
| Mannitol: | 10.0 g/L |
| Bactoagar: | 1.3 % |
| pH: | 7.0 |

Incubar: a 28°C por 48 horas y mantener placas a 4°C en almacenamiento temporal (1 semana aproximadamente.)

Tubos de inoculación: contienen 3 ml de medio líquido YEP con los antibióticos apropiados con colonias puras de bacterias.

| | |
|----------------|--------|
| Bacto Peptone: | 10 g/L |
|----------------|--------|

| | |
|----------------------|--------|
| Bacto Yeast Extract: | 10 g/L |
| NaCl: | 5 g/L |
| pH: | 7.5 |

En tubos de prueba de 15 ml, e incubar a 28°C, 210 rpm a un OD600 de 1.2 unidades (30 hrs aproximadamente.)

Tres mililitros de medio son suficientes aproximadamente para media placa de infección luego de la dilución.

Placas de infección: preparar placas tituladas de 24-pocillos para infección, añadiendo 200 uL (usar puntas azules de pipeta cortadas) de 33% de suspensión de células seleccionadas del medio por pocillo.

Dilución de bacterias cultivadas: centrifugar a 3430 x g durante 10 minutos; descartar el sobrenadante y suavemente resuspender el precipitado en medio ZZ líquido esterilizado por filtro (pH 5.6 como mínimo); suplementar con acetosyringone (AS). La concentración final del AS debe ser 200 uM desde una solución en stock preparada de DMSO a 500 mM (no debe estar esterilizada pero debe ser recién preparada siempre). Medir DO600, y ajustar con el medio citado a 0.4 unidades.

Infección: Añadir cuidadosamente 1 mL de la suspensión de bacteria diluida-inducida para cada malla de las placas de infección.

Condiciones de la infección: Incubar la mezcla de bacteria – células de la planta por 6 horas a 25 °C y 25 rpm en oscuridad.

Transferir a placas de cocultivo: Pipetear suavemente la mezcla de las células usando puntas cortadas de pipeta y transferir a una malla de poliéster de 50 um, ubicada en la cima de un grupo de papeles filtros esterilizados para eliminar el medio líquido.

Transferir la malla de poliéster que contenga las células a las placas de cocultivo

Placas de cocultivo: Medio semisólido ZZ. Tener cuidado al ajustar el pH a 5.9 luego de añadir el PHytagel. Después de autoclavar, dejar enfriar el medio hasta 60 °C y añadir AS al final 200 uM. El pH final del medio debe ser 5.6. Usar 10mL de medio por placa petri de 5-cm de diámetro. Estas placas pueden ser preparadas un día antes del experimento y almacenadas a 4 °C.

Condiciones de Cocultivo: 21 °C en la oscuridad por 6 días.

Prueba de expresión transitoria: Preparar placas petri de 5 cm de diámetro con papel filtro de un diámetro de 45 mm. Cinco o seis días después de la infección, colocar la malla de poliéster con las células en la cima de los papeles filtro y saturar con 500 uL de solución X-GLUC (EMBO 93). Cerrar las placas y sellarlas bien con plástico

adhesivo (rollypack) antes de incubar a 37 °C por 4 horas. Contar el número de puntos azules bajo el microscopio binocular.

Selección de los transformantes: Empezar la selección en medio ZZ con Timentina (200 mg/L) y el antibiótico selectivo apropiado (Higromicina o Geneticina son usados a 50 ug/mL) en placas petri de 5 cm de diámetro. Incubar en oscuridad a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por dos meses, con subcultivos cada dos semanas. Transferir a RD1 (individualmente a placas de 24-pocillos, 0.8 de 1.0 mL de medio selectivo o no selectivo por pocillo), RD2 (individualmente en tubos de prueba de vidrio o 4-6 colonias en placas petri) y Reg (tubos de prueba) medio para regeneración de plantas (usualmente no se requiere Timentina para el control de *Agrobacterium* luego de la selección de dos meses en placas con ZZ).

APENDICE C

PROTOCOLO DEL ENSAYO FLUOROMÉTICO PARA MEDIR ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL GEN GUS

1. Aislamiento de proteína.

Buffer de extracción GUS (EB), debe ser fresco, hecho diariamente.

| Compuesto | Concentración final. | Stock | for 50 ml EB |
|-----------------------------|----------------------|-------|--------------------|
| Methanol | 20% | | 10 ml |
| Na-phosphate buffer, Ph 7,0 | 50mM | 0,5M | 5 ml |
| Na ₂ -EDTA | 10mM | 100mM | 5 ml |
| β-mercapto-ethanol (v/v) | 0,07%(v/v) | | 35μl |
| Sodium lauryl sarcosine | 0,1% (v/v) | 35% | 143μl |
| Triton X-100 | 0,1%(v/v) | | 50μl |
| PVP (W/V)-MW=10000 | 2%(w/v) | | 1 g |
| MilliQ H ₂ O | | | completar a 50 ml. |

1.1 Colocar 150 mg de tejido de la hoja en un tubo de 2 ml con las bolas de acero y moler en el molino molidor a 4x20 seg, 25/seg.

1.2 (Guardar de ser necesario a -80°C.)

1.3 Agregar 750 μl de buffer de extracción.

1.4 Sacudir por 20 seg, 15/seg en el molino molidor.

1.5 Centrifugar por 10 min a 12500 rpm a 4°C.

1.6 Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf siliconizado previamente enfriado en hielo y centrifugar 10 min a 12500 rpm a 4°C.

1.7 Dispensar el sobrenadante en alícuotas (en eppendorf siliconizado) y almacenar a -80°C.

2. **Concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas de las muestras es medida usando el ensayo Bradford.

2.1 La configuración de la placa será mostrada en la parte inferior.

2.2 Transferir 20 µl MQ H₂O en todos los pocillos de la placa de 96 pocillos MTP (flat bottom, 655101, Greiner).

2.3 Agregar 20 µl de cada muestra en los pocillos A, C y E (dilución 1:2) y hacer una dilución doble in los pocillos B, D y F (dilución 1:4), respectivamente. Incluir una repetición por muestra. (Cuando altas concentraciones de proteínas son esperadas, es mejor hacer diluciones de 1:4 y 1:8 de cada muestra, pero no hay que olvidar cambiar la configuración de la placa en la computadora (no hay que cambiar el programa original, hay que crear uno

nuevo con un nombre diferente antes de empezar a cambiarlo) En este caso es más fácil hacer diluciones en tubos y transferir 20 μ l a los pocillos de la placa).

- 2.4 Preparar una solución stock de BSA de 2 mg/ml en agua MilliQ. Hacer series de diluciones dobles del BSA empezando con 1 mg/ml en G1 y H1 y diluirlo hasta G6 y H6, respectivamente. (estándar hecho con repetición).
- 2.5 Los blancos contienen 20 μ l de agua MilliQ solamente (G7-G8-H7-H8).
- 2.6 Agregar exactamente 250 μ l de Bradford reagent en cada pocillo e incubar de 10 a 15 min a temperatura ambiente.
- 2.7 Medir la absorbancia a 595 nm usando GEN5.
- 2.8 Calcular el contenido total de proteínas (μ g/ml) usando la parte lineal de la curva estándar.

3. Reacción enzimática.

3.1 Buffer del ensayo MUG (TU007).

Preparar el stock de la solución del ensayo MUG, que contenga 20 mM de MUG disolviendo 3.5 mg de MUG(4-metHylumbelliferyl- β -D-glucoronide- MW = 406.35 g/mol) en 0.5 ml del buffer de extracción GUS. Diluir el stock 20 veces en buffer de extracción GUS para obtener un buffer del ensayo con una concentración de 1 mM.

El buffer del ensayo MUG puede ser almacenado en la oscuridad a 4°C por un máximo de unos pocos días.

3.2 SOLUCIÓN DE PARADA (STOP BUFFER).

0.2 M Na_2CO_3 (2.12g/100ml) en agua MilliQ y puede ser almacenado por algunas semanas a 4°C.

3.3 Solución stock de MU.

Preparar una solución stock 20 mM de MU (4-metHylumbelliferone – MW = 198.2 g/mol) disolviendo 4 mg de MU en 100 μl de DMSO (dimetHylsulfoxide) y agregar 900 μl del buffer de extracción GUS. Diluir esta solución stock 100 veces (2x10 veces) para obtener una solución de MU 200 μM .

Todas las diluciones son hechas en el buffer de extracción GUS.

La solución stock puede ser almacenada en la oscuridad a 4°C por algunas semanas.

3.4 MU estándar

Preparar las diluciones estándar en duplicado en tubos eppendorf de 2 ml (trabajar en hielo) durante la incubación de las muestras (ver 3.5)

| MU 200µM | GUS EB | STOP BUFFER | CONCENTRACIÓN FINAL | CONCENTRACIÓN FINAL |
|-------------|-----------|----------------|------------------------|------------------------|
| µl | µl | µl | MU µM | MU nM |
| 0,5 | 99,5 | 1900 | 0,05 | 50 |
| 1 | 99 | 1900 | 0,1 | 100 |
| 2 | 98 | 1900 | 0,2 | 200 |
| 4 | 93 | 1900 | 0,4 | 400 |
| 10 | 90 | 1900 | 1 | 1000 |
| 20 | 80 | 1900 | 2 | 2000 |
| 30 | 70 | 1900 | 3 | 3000 |
| 40 | 60 | 1900 | 4 | 4000 |
| 60 | 40 | 1900 | 6 | 6000 |
| 80 | 20 | 1900 | 8 | 8000 |
| 100 | 0 | 1900 | 10 | 10000 |

3.5 Procedimiento del ensayo MUG.

La configuración de la placa puede ser vista en la parte inferior.

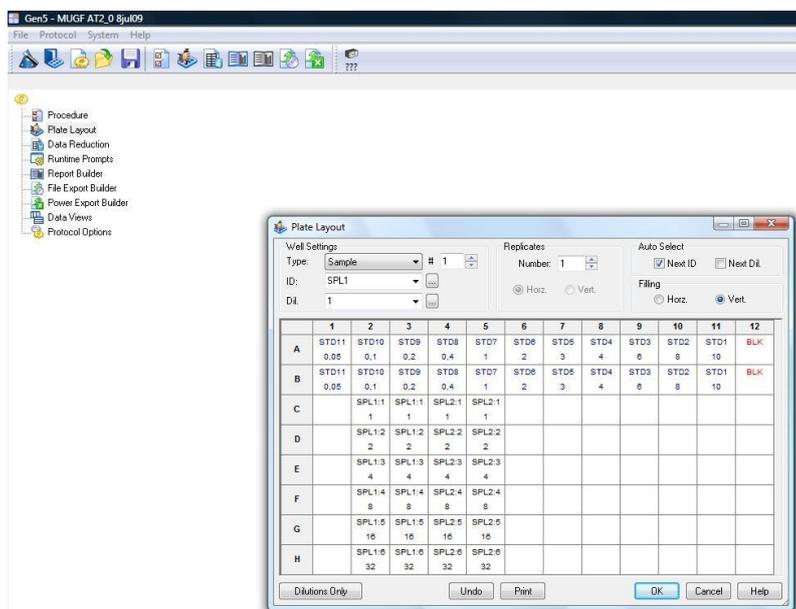
3.5.1 Tubos normales eppendorf que contengan 200µl del buffer del ensayo MUG, previamente calentados a 37°C.

- 3.5.2 Agregar 50 μ l del extracto de la planta con una concentración conocida de proteínas en cada tubo e incubar a 37°C. Cada extracto debe tener su repetición.
- 3.5.3 Después de una hora de incubación, poner las muestras en hielo.
- 3.5.4 De este punto en adelante, trabajar con hielo.
- 3.5.5 Hacer una serie de diluciones dobles (1:1 – 1:32) de cada muestra en el buffer de extracción GUS usando tubos eppendorf normales. (Para hacer la serie de diluciones en pares: Transferir 50 μ l del reaction mix a un tubo que contenga 50 μ l de buffer de extracción GUS, mezclar bien pipeteando algunas veces (dilución 1:2) y transferir 50 μ l al siguiente tubo que también contiene 50 μ l del buffer de extracción GUS, mezclar bien (1:4) y transferir al siguiente tubo, etc.). Dependiendo de la concentración total de proteínas y de la actividad esperada del gen GUS, el número de diluciones podrá ser limitado (ej. 1:8, 1:16 y 1:32).
- 3.5.6 Transferir 10 μ l de cada dilución a una placa negra microtiter (serie de dilución (C-H) y agregar 190 μ l de STOP BUFFER.

Transferir 200 μ l de las muestras del estándar (ver 3.4) en duplicado (A-B), y como blanco (10 μ l del buffer de extracción GUS y añadir 190 μ l de STOP BUFFER) (A12-B12) a la placa microtiter.

3.5.7 La fluorescencia será medida usando el lector de placas Synergy HT, con el programa GEN5.

3.5.8 De ser necesario, mediciones adicionales se podrán hacer después de 30 o 120 minutos.



4 Fórmula.

En un pocillo hay 10 μ l de reacción mix y 190 μ l de stop buffer, entonces el reaction mix esta 20 veces diluido. En el raction mix, la muestra de proteína está 5 veces diluida (50 μ l de muestra + 200 μ l del buffer de extracción GUS). Para saber la concentración de MU en la muestra de

proteína (en μM) la concentración dada por el programa debe ser multiplicada por 100 (5 x 20).

La concentración del MU se necesita en nM.

Picomol= (nM muestra MU) / (tiempo de incubación(h) x concentración de proteínas ($\mu\text{g/ml}$))

APENDICE D

RESULTADO X-GLUC

Conteo de puntos azules luego de 14 horas de exposición al reactivo X-GLUC en células embriogénicas transformadas

| Plásmido | Número de puntos azules |
|-----------------|--------------------------------|
| Pcambia 1301 | 239 |
| Pcambia 1301 | 133 |
| Pcambia 1301 | 175 |
| 1391z | - |
| 1391z | - |
| 1391z | - |
| PESKUL1 | - |
| PESKUL1 | - |
| PESKUL1 | - |
| PESKUL7 | 11 |
| PESKUL7 | - |
| PESKUL7 | 7 |
| CONTROL | - |
| CONTROL | - |
| CONTROL | - |

APENDICE E

PRIMERS

Secuencia de Primers utilizados en la PCR, para la determinación del gen reportero GUS, en líneas transgénicas de banano.

| PRIMER F | PRIMER R |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 85F (TTCGACGTTTGTT TGGTGAA) | GUSR (GACCCACACTTTGCCGT AAT) |
| 17F (CTTCTTTTCCGGG GATTTTC) | GUSR (GACCCACACTTTGCCGT AAT) |
| GUSF (TTCTTGTTAGGA CCCTTTTCTC) | GUSR (GACCCACACTTTGCCGT AAT) |

APENDICE F

ANÁLISIS DE VARIANZAS

Prueba de Duncan para los promotores bajo las diferentes dosis de agente selectivo.

| Análisis de la varianza | | | | | |
|----------------------------------------------------|--------|----------------|-------------------|--------|---------|
| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV | |
| PUNTOS AZULES | 700 | 0.63 | 0.63 | 95.34 | |
| Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) | | | | | |
| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
| Modelo | 91.05 | 6 | 15.17 | 196.56 | <0.0001 |
| PLASMIDO | 91.05 | 6 | 15.17 | 196.56 | <0.0001 |
| Error | 53.5 | 693 | 0.08 | | |
| Total | 144.55 | 699 | | | |
| Test:Duncan Alfa=0.05 | | | | | |
| Error: 0.0772 gl: 693 | | | | | |
| PLASMIDO | Medias | n | E.E. | | |
| PESKUL 1 (-) | 0 | 100 | 0.03 | A | |
| PESKUL 7 (-) | 0.02 | 100 | 0.03 | A | |
| PESKUL 1 HyHy12,5 | 0.02 | 100 | 0.03 | A | |
| 1301 (-) | 0.14 | 100 | 0.03 | | B |
| PESKUL7 HyHy12,5 | 0.15 | 100 | 0.03 | | B |
| 1301 HyHy12,5 | 0.85 | 100 | 0.03 | | C |
| 1301 HyHy18 | 0.86 | 100 | 0.03 | | C |

| Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|----|------------|-------|---------|---|
| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor | |
| Modelo | 8290816.75 | 4 | 2072704.19 | 19.39 | 0.0001 | |
| Columna1 | 8290816.75 | 4 | 2072704.19 | 19.39 | 0.0001 | |
| Error | 1069011.84 | 10 | 106901.18 | | | |
| Total | 9359828.59 | 14 | | | | |
| Test:Duncan Alfa=0.05 | | | | | | |
| Error: 106901.1844 gl: 10 | | | | | | |
| Columna1 | Medias | n | E.E. | | | |
| 7 DIAS | 22.81 | 3 | 188.77 | A | | |
| 10 SEM HyHy12,5 | 354.23 | 3 | 188.77 | A | B | |
| 3M HyHy12,5 | 746.07 | 3 | 188.77 | | B | |
| 3M HyHy18 | 759.07 | 3 | 188.77 | | B | |
| 10 SEM HyHy18 | 2199.15 | 3 | 188.77 | | | C |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p \leq 0.05$) | | | | | | |

Prueba de Duncan de los tratamientos de agente selectivo higromicina a concentración 18 y 12 µg/ml, demuestran diferencias estadísticamente significativas, siendo la más efectiva la concentración Hy18 µg/ml.

| Análisis de la varianza | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------|-------------------|--------|---------|
| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV | |
| COLONIAS SOBREVIVIEN | 200 | 0.02 | 0.02 | 169.87 | |
| Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) | | | | | |
| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
| Modelo | 0.84 | 1 | 0.84 | 4.5 | 0.0351 |
| CONCENTRACION | 0.84 | 1 | 0.84 | 4.5 | 0.0351 |
| Error | 37.15 | 198 | 0.19 | | |
| Total | 37.99 | 199 | | | |
| Test: Duncan Alfa=0.05 | | | | | |
| Error: 0.1876 gl: 198 | | | | | |
| CONCENTRACION | Medias | n | E.E. | | |
| HyHy 18 | 0.19 | 100 | 0.04 | A | |
| HyHy 12,5 | 0.32 | 100 | 0.04 | B | |
| Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p \leq 0.05$) | | | | | |

APENDICE G

RESULTADO BIOINFORMÁTICO

Resultado del análisis bioinformático con el software **Softberry** de la secuencia de ADN del Promotor 17-1.

> test sequence

Length of sequence- 1748

Thresholds for TATA+ promoters - 0.02, for TATA-
/enhancers - 0.04

2 promoter/enhancer(s) are predicted

Promoter Pos: 1233 LDF- 0.12

Promoter Pos: 431 LDF- 0.04

APENDICE H

LUGARES DE RECONOCIMIENTO DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Transcription factor binding sites/RegSite DB:

for promoter at position - 1233

| | | | |
|------|-----|----------|----------------------------|
| 961 | (-) | RSP00004 | tagaCACGTaga |
| 952 | (+) | RSP00010 | cACGTG |
| 949 | (+) | RSP00011 | ctccACGTGgt |
| 943 | (+) | RSP00026 | gcttttgaTGACtTcaaacac |
| 1152 | (+) | RSP00026 | gcttttgaTGACtTcaaacac |
| 953 | (+) | RSP00065 | ACGTGgcg |
| 953 | (+) | RSP00066 | ACGTGccgc |
| 952 | (+) | RSP00069 | tACGTG |
| 1182 | (+) | RSP00096 | GGTTT |
| 948 | (+) | RSP00102 | aaaTGACGaaaatgc |
| 1157 | (+) | RSP00102 | aaaTGACGaaaatgc |
| 1046 | (-) | RSP00102 | aaaTGACGaaaatgc |
| 997 | (-) | RSP00102 | aaaTGACGaaaatgc |
| 951 | (+) | RSP00113 | TGACGTGGC |
| 1140 | (-) | RSP00148 | CGACG |
| 951 | (+) | RSP00214 | TGACGTgg |
| 1160 | (+) | RSP00214 | TGACGTgg |
| 1216 | (-) | RSP00252 | CACATG |
| 936 | (+) | RSP00269 | atcttatgtcattgaTGACGacctcc |

| | | | |
|------|-----|----------|----------------------------|
| 1145 | (+) | RSP00269 | atcttatgtcattgaTGACGacctcc |
| 1058 | (-) | RSP00269 | atcttatgtcattgaTGACGacctcc |
| 1009 | (-) | RSP00269 | atcttatgtcattgaTGACGacctcc |
| 1156 | (-) | RSP00316 | AACCAA |
| 1096 | (-) | RSP00400 | CGGTTG |
| 1167 | (-) | RSP00401 | TAACGT |
| 1219 | (+) | RSP00403 | CAGTTG |
| 1080 | (-) | RSP00422 | ACCGAC |
| 952 | (+) | RSP00423 | GACGTG |
| 957 | (-) | RSP00424 | CACGTC |
| 1101 | (-) | RSP00431 | rdygRCRGTTRs |
| 1070 | (+) | RSP00432 | cVacGGTaGGTgg |
| 1165 | (-) | RSP00437 | ACGTCA |
| 956 | (-) | RSP00437 | ACGTCA |
| 1226 | (+) | RSP00463 | atctcatggCCGACctgctttttt |
| 1150 | (-) | RSP00463 | atctcatggCCGACctgctttttt |
| 1088 | (-) | RSP00463 | atctcatggCCGACctgctttttt |
| 1226 | (+) | RSP00464 | acttgatggCCGACctctttttt |
| 1150 | (-) | RSP00464 | acttgatggCCGACctctttttt |
| 1088 | (-) | RSP00464 | acttgatggCCGACctctttttt |
| 1226 | (+) | RSP00465 | aatatactaCCGACcatgagttct |
| 1150 | (-) | RSP00465 | aatatactaCCGACcatgagttct |
| 1088 | (-) | RSP00465 | aatatactaCCGACcatgagttct |

1231 (+) RSP00466 actaCCGACatgagttccaaaaagc
 1145 (-) RSP00466 actaCCGACatgagttccaaaaagc
 1083 (-) RSP00466 actaCCGACatgagttccaaaaagc
 970 (-) RSP00470 GTGGNG
 1159 (-) RSP00477 TTTAA
 1057 (-) RSP00477 TTTAA
 990 (+) RSP00512

cttgtaacCATCAgccaatcgaccagccaatcattc

for promoter at position - 431

422 (+) RSP00004 tagaCACGTaga
 426 (+) RSP00010 cACGTG
 431 (-) RSP00010 cACGTG
 423 (+) RSP00011 ctccACGTGgt
 427 (+) RSP00065 ACGTGgcg
 430 (-) RSP00065 ACGTGgcg
 427 (+) RSP00066 ACGTGccg
 430 (-) RSP00066 ACGTGccg
 426 (+) RSP00069 tACGTG
 431 (-) RSP00069 tACGTG
 293 (-) RSP00096 GGTTT
 191 (+) RSP00122 CTCCCAC
 426 (+) RSP00010 CACGTG
 431 (-) RSP00010 CACGTG

| | | | |
|-----|-----|----------|--------------------------|
| 254 | (+) | RSP00148 | CGACG |
| 152 | (-) | RSP00308 | CAACA |
| 349 | (-) | RSP00438 | GGCGGC |
| 211 | (-) | RSP00438 | GGCGGC |
| 244 | (+) | RSP00463 | atttcatggCCGACctgcttttt |
| 244 | (+) | RSP00464 | acttgatggCCGACctctttttt |
| 244 | (+) | RSP00465 | aatatactaCCGACcatgagttct |
| 249 | (+) | RSP00466 | actaCCGACatgagttccaaaagc |
| 265 | (-) | RSP00470 | GTGGNG |
| 422 | (+) | RSP00479 | aggaCACGTGtcgc |
| 206 | (+) | RSP00483 | GCCGC |
| 232 | (+) | RSP00483 | GCCGC |
| 344 | (+) | RSP00483 | GCCGC |

Secuencia de ADN: EU161097 perteneciente al promotor 17-1.

TCCGTAGAGATGATCCATGAGCAATTTTGAAGAGATCGCCAAATATGAACCGACAGAAGA
TATATAGTGACAGAACCAACCTTCCGCTCCCAGCTTGGATCGGGCCCTGTGGTCGTTCAA
GATCGACAGGCCGTGCTTGAGGACCTTGTTGGATCGCCGGGCCTTGAGCTTGCGCACGAG
GCAGAGGTACTCCCACGCCCCCGCCGCGTTCTCGACCTGGCTCTCGAGCCGCTCCAT
CCGCGCTGCCTCCGACGCCCCACCATCGGCCTGCGCTTGCCGGCGAAAACCTCCTTGCG
GGCGAGATGTAGAAGGAAGAGAGAGGAAACAGAGCAACGCCGGCCGCGTGATTCCAATA
GCGATCGTCCTCGAAAGCAATGGGAGATCCAAGGAAAACGTACCCAGAACAGATCCTCT
CCAGCACGTGTCGGATCCAATAGCTCCTCTCCACAGCCCAGCCGTCCACAGTGGGATCCA

CGTGCATCAATGATACCAATGGAGGGTTACGATAGAAGAATGAGCGGATGGAGGGTGGAG
ATCGAGAGAGGTTAATCATCGGACAGGTTGATTTGGAGAGGATCACATAAACCTTCGTC
CAAGGCGGATCCGATGACATGACTGGAGTTGGGTTATTGGACTTGGGGCTCGATCTAGAC
TCGCAACACATGAGATATGAACTCGGGTGCAAATGAGTCCAATCCATCTGAAAACAGTTC
AAATTTATTCGTTAATATTAATGGTGTTTAATTAATTATTTATTTATCTTAACCATGATT
GCTTGTATTGGAGACCGAGGCAGAAAAATTAATAGATTAATAAATAAAATGAAATAACAAA
AAATAGAAATCTTAAATCAATTAATGGAATCCGGACCCGATTAGAGCGGGTCGCATATG
ATAAATCCGACCCGCTGCCATCCGCTATCGCATCGGGTCAGCGTGAGACTGACGTGGCAC
GCGCGCCACTGTTACTTGGTACACCAAGCGTCACAGCATCACACAAAGGGAGTGCTTCGC
GCACTCGCAGAAACGCCCGTCATCTCCTCGATTAAAATTTATATGCGGACAAGGTCGGTC
CTTCGATTCCAACCGTTGATGATCTCGCATAGGGATCGCTTCCGGACGTACGCCGTCGG
ATGTTATCGTTGGTTAAATGACGTTAATACCCTTGCCTCGGTTTCTTGTGCCTCCCTCA
CGCCTCTCGCATGTGATCAGTTGCTAATCCAACCCGACCCGCCACACCTCTCTCTCTCT
CTCTCTCCCTCCCTCCTCACCCACCCACCCACCCCGGGGAGACTACGGTAGATCTC
AGATCGGAACTCTCATTGATCGTTTCTCTCGGGTTAATATACGCGGTGCGGAGGACGGAG
GAAGCTCGAATCGGTTCTTTCTTGCTCAATTCAGCCAGGTACAGCTCTCCTGACTTCTT
TTCCGGGGATTTTCCCTCTTTTCGATGTTAATGTGGTGCTGAATTTTATGAGTTCC
TGTTGGTGGATCTGCACGCTGAGATGAGTAGGATTCATTTCCGGTTCTATATTTCCGTAG
TTACTTTGTAGTTCGTCTCATCGGATTAGGGCTTAGTTTTTTCTTAATGTAAGGTTTAG
GGATTTGTTATGCTCTGTAAGTAATTGGTTATGTTACACGCTTCGGAACAATAAATTAGG
TCTGTTGCGAGATCGGAAACGATTGGATGCCAGGAAACATGACACTTGGACTATGCGCGT
GTTGCTT

BIBLIOGRAFÍA

1. Aebe, *Economía ecuatoriana creció en el 2011 y crecerá en el 2012*, in *bananotas*. 2011, aebe: ecuador.
2. Vega, h. And e. Purdy, *Banana prices plunge, government of ecuador agrees to subsidize producers.*, in *gain report.*, g.a.i. Network, editor. 2011, usda foreign agricultural service: quito.
3. Galileo rivas, f.r., *Manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musaceas en los tropicos*. 2003: guayaquil- ecuador. P. 13.
4. Maredia, k.m., d. Dakouo, and d. Mota-sanchez, *Integrated pest management in the global arena*. 2003, wallingford, oxon ; cambridge, ma: cabi pub. Xxv, 512 p.
5. Robinson, j.c. And v. Galán saúco, *Bananas and plantains*, in *crop production science in horticulture series*. 2011, cabi: cambridge, ma.

6. , j.m. And d. Wood, *Agrobiodiversity management for food security : a critical review*. 2011, wallingford,oxfordshire ; cambridge, ma: cabi. Viii, 239 p.
7. Moschini, g., *Genetically modified food and global welfare*. First edition ed. Frontiers of economics and globalization, ed. H. Beladi and k. Choi. Vol. 10. 2011, uk: emerald group publishing. 380.
8. Jorge, l., *Fundamentos botanicos de los cultivos tropicales*, iica, editor. 1968: lima.
9. Rica, u.e.a.d.s.j.c., *El Banano*, in *atlas agropecuario de costa rica*, g.c. Enriquez, editor. 1994: san jose. P. 154.
10. Ray, p.k., *Breeding tropical and subtropical fruits*. 2002, narosa publishing publishing house ;Springer-verlag: new delhiBerlin ; new york. P. Xvi, 338 p.
11. Charrier, a. And m.k. Razdan, *Tropical plant breeding*. 2001, science publishers ;Cirad: enfield, nhFrance. P. lx, 569 p., 24 p. Of plates.
12. Winch, t., *Growing food : a guide to food production*. 2006, dordrecht: springer. lx, 333 p.
13. Jones, d.r., *Diseases of banana, abacá, and enset*. 1999, wallingford, oxon, uk ; new york: cabi pub. Xv, 544 p.
14. Su, c.-h., a. Ishdorj, and d.j. Leatham, *An analysis of the banana import market in the u.s.*, in *southern agricultural economics*

- association annual meeting*. 2011, department of agricultural economics, texas a&m university: corpus christi texas. P. 14.
15. Aebe. *El negocio bananero del ecuador*. 2010 [9-enero-2011]; available from: <http://www.aebe.com.ec/desktop.aspx?id=44>.
 16. Magap. *Comercio exterior: indice de los principales productos de exportacion*. 2009 [cited 2011; available from: http://www.magap.gob.ec/sigagro/charts/comext_exportaciones.htm#].
 17. Corpei. *Perfil de banano*. 2010 [cited 2010 4-01-11]; exporta ecuador]. Available from: <http://www.ecuadorexporta.org/contenido.ks?contenidoid=312&contenidoid=312>.
 18. Garcia, e.l. (2009) *Analisis de la industria bananera ecuatoriana del 2009*.
 19. Trade, e. *Banano*. 2010 [cited 2011 10-01-2011]; available from: <http://www.ecuadortrade.org/contenido.ks?contenidoid=1039>.
 20. Magap. *Banano: superficie, producción y rendimiento a nivel nacional Serie histórica 2000 - 2010*. 2011; available from: http://www.magap.gob.ec/sinagap/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&itemid=414.
 21. Holliday, p., *Fungus diseases of tropical crops*. Dover ed. 1995, new york: dover publications. Xv, 607 p.

22. Craenen, k., *Black sigatoka disease of banana and plantain* In a *reference manual*, t. Owoeye, editor. 1998, international institute of tropical agriculture: ibadan.
23. Agrios, g.n., *Plant pathology*. 5th ed. 2005, burlington, ma: elsevier academic press. Xxiii, 922 p.
24. Ploetz, r.c., *Diseases of tropical fruit crops*. 2003, wallingford, oxon, uk ; cambridge, ma: cabi pub. Xxi, 527 p., 24 p. Of plates.
25. Agropecuarios. *La sigatoka, peor enemigo*. El universo 2010 [cited 2011;available from: <http://www.eluniverso.com/2010/12/11/1/1416/sigatoka-peor-enemigo.html?p=1416a&m=256>.
26. Jacome, I. And international network for improvement of banana and plantain., *mycosphaerella leaf spot diseases of bananas : present status and outlook : proceedings of the 2nd international workshop on mycosphaerella eaf spot diseases held in san josé, costa rica, 20-23 may 2002*. 2003, montpellier, france: inibap. 317 p.
27. S.e.c.f, *Diccionario forestal*, in *sociedad española de ciencias forestales*, e.m. Prensa, editor. 2005: españa.
28. Chong, p., *Diversidad genetica de poblaciones de mycosphaerella fijiensis morelet provinientes de haciendas bananeras con manejo organico y convencional*, in *facultad de ingenieria en mecanica y ciencias de la produccion*. 2007, espol: guayaquil.

29. Churchill, a.c.l., *Mycosphaerella fijiensis, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control*. Molecular plant pathology, 2010: p. 22.
30. Naqvi, s.a.m.h., *Diseases of fruits and vegetables : diagnosis and management*. 2004, dordrecht ; boston: kluwer academic publishers.
31. Alba, r., *induccion de resistencia en plantas. Interaccion planta-patogeno*. 2010, san josé: iica. 261.
32. Inibap, *The improvement and testing of musa: a global partnership*, in *proceeding of the first global conference of the international musa testing program held at fhia*. 1994: Honduras. P. 50.
33. Islam, n., *Population and food in the early twenty-first century : meeting future food demands of an increasing population*. 1995, Washington, d.c.: international food policy research insitute. Xiv, 239 p.
34. Pocasangre, f.r.y.l. *Mejoramiento convencional de banano y platano estrategias y logros*. In *acorbat 2002*. 2002. Colombia.
35. Fao., *The state of food and agriculture*. 2004, Rome. 210.
36. Walker, h.w., r.g. Kline, and c.j. Arnold, *Farm adjustment opportunities : southside virginia*. Technical bulletin / virginia agricultural experiment station. 1961, Blacksburg, va.: virginia agricultural experiment station. 47 p.

37. Kodjo tomekepe, c.j.y.j.-v.e., *Analisis de las estrategias de mejoramiento convencional de musa*. Infomusa. **13**(2): p. 2.
38. Chaplin, j.f., t.j. Mann, and North Carolina agricultural experiment station., *Interspecific hybridization, gene transfer and chromosomal substitution in nicotiana*. Tech bul / North Carolina agricultural experiment station. 1961, Raleigh, n.c.: North Carolina agricultural experiment station in cooperation with the crops research division, agricultural research service, united states department of agriculture. 31 p.
39. Miles, j., *Brachiaria: biologia, agronomia y mejoramiento*, e.a. Tropical., editor. 1998, ciat: Colombia.
40. Turgeon, s.c., et al., *Contrasting osmium isotopes and zn/al ratios as magmatism proxies in cenomanian-turonian sediments*. Geochimica et cosmochimica acta supplement, 2009. **73**: p. A1354.
41. Vallejo, f., *mejoramiento genetico de plantas*, u.n.d. Colombia., editor. 2002, dipal: Cali.
42. Omoto, c.k. And p.f. Lurquin, *Genes and DNA : a beginner's guide to genetics and its applications*. 2004, New York: columbia university press. Xviii, 217 p.
43. Tagu, d. And c. Moussard, *techniques for molecular biology*. 2006, enfield, nh: science publishers. Vii, 227 p.

44. Santos, e., *Characterization and isolation of t-dna tagged banana promoters active during in vitro regeneration and low temperatura stress*, in *departement biosystemen*. 2008, Katholieke Universiteit Leuven: Leuven. P. 214.
45. Brown, w.m. And p.m. Brown, *Transcription*. Cell and biomolecular sciences. 2002, London ; New York: taylor & francis. lx, 158 p.
46. Carey, m. And s.t. Smale, *transcriptional regulation in eukaryotes : concepts, strategies, and techniques*. 2000, cold spring harbor laboratory press: cold spring harbor, ny. P. Xxix, 640 p.
47. Acquaah, g., *principles of plant genetics and breeding*. 2007, blackwell pub.: malden, ma ; oxford. P. Xii, 569 p.
48. Jefferson, r.a., t.a. Kavanagh, and m.w. Bevan, *Gus fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants*. *Embo j*, 1987. **6**(13): p. 3901-3907.
49. Jackson, j.f., h.f. Linskens, and r.b. Inman, *Testing for genetic manipulation in plants*, in *molecular methods of plant analysis*. 2002, springer: Berlin ; New York. P. Xvii, 194 p.
50. Di renzo, j.a., c. Fernando, g. Laura, t, elena margot, diaz, maria del pilar, r. Carlos, b. Monica *Estadísticas para las ciencias agropecuarias*, f.c. Julio di renzo, editor. 2005: Argentina. P. Pg 246.
51. Silva, e., *Disenos Experimentales*. 2008, Escuela Superior Politecnica Del Litoral: Guayaquil. P. 44-49.

52. Wang, k., *Agrobacterium protocols*. 2nd ed. Methods in molecular biology. 2006, Totowa, n.j.: humana press.
53. Jimenez, m.i., *Effect of the nutritional status of banana (musa spp) on leaf disease infestation by mycosphaerella fijiensis morelet in ecuador*, in *departement biosystemen*. 2008, Katholieke Universiteit Leuven: Leuven. P. 161.
54. Mohammed, u., m. Sung, and e. Al., *An improves method for agrobacterium-mediated genetic transformation from cotyledon explants of brassica juncea*. Plant biotechnology, 2011. **28**: p. 17-23.
55. Pua, e.c. And m.r. Davey, *Transgenic crops iv*. Biotechnology in agriculture and forestry. 2007, Berlin ; London: springer. 476 p.
56. Jain, s.m. And s.c. Minocha, *Molecular biology of woody plants*. Forestry sciences. 2000, dordrecht ; Boston: kluwer academic. V.
57. Sanchez, e., *Estandarizacion del protocolo de transformacion genetica de células embriónicas de banano variedad 'williams'(aaa) mediada por agrobacterium tumefaciens in facultad de ingeniería en mecánica y ciencias de la producción*. 2010, ESPOL: Guayaquil. P. 43-46.
58. Santos, e., et al., *Characterization and isolation of a t-dna tagged banana promoter active during in vitro culture and low temperature stress*. BMC plant biology, 2009. **9**: p. 15.