



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la  
Producción**

“IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS EN PLANTAS DE  
BANANO: EFECTO DE INOCULACIÓN CON *Mycosphaerella*  
*fijiensis* Morelet”.

**TESIS DE GRADO**

Previo a la obtención del título de:

**INGENIERO AGRÍCOLA Y BIOLÓGICO**

Presentada por:

Ricardo Humberto Pacheco Coello

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2014

## AGRADECIMIENTO

A Dios, nuestro padre celestial que me ha dado la fuerza y salud para culminar mis estudios.

A mis padres Bolívar y Norma por su apoyo incondicional y por el gran esfuerzo que realizaron en la formación profesional de sus hijos.

Mis hermanos María José y Jefferson por la ayuda que me brindan cuando los necesito.

A mi novia Rosita por sus palabras de aliento y motivación para salir adelante y por su gran amor.

A todos mis amigos y compañeros de carrera, en especial a Carlos Riera, Peter Noriega, Andrés Ochoa, José García, Jorge Mendoza, Víctor García.

Agradezco enormemente a la Ph.D. Esther Peralta Directora del CIBE-ESPOL y al Ph.D. Efrén Santos Jefe del área de Biología Molecular y director de tesis por su apoyo durante el desarrollo en la tesis de grado, y a todo el personal del laboratorio de B.M. en especial al Ph.D. Oscar Navarrete y a la Ing. Lisette Hidalgo.

A todos los profesores de la carrera Ingeniería Agrícola y Biológica por sus enseñanzas y experiencias transmitida a sus alumnos.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Bolívar Pacheco y  
Norma Coello.

A mis hermanos María José y  
Jefferson.

A mi novia Rosa Rivera A.

A Rocky y Terry.

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

Dr. Kleber Barcia V., Ph.D  
**DECANO DE LA FIMCP**  
**PRESIDENTE**

---

Dr. Efrén Santos O., Ph.D  
**DIRECTOR**

---

Dr. Eduardo Chica M., Ph.D  
**VOCAL**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

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

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

---

Ricardo Humberto Pacheco Coello

## RESUMEN

Se realizaron dos ensayos para determinar la interacción planta – patógeno en banano y sigatoka negra en el invernadero del CIBE - ESPOL, para lo cual se usaron dos variedades de banano resistente y una variedad susceptible a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Cada ensayo se lo realizó en diferentes épocas y variedades. En el primero se evaluó la variedad 'Calcutta 4' (resistente) y la variedad 'Williams' (susceptible). Cada una fue inoculada con el hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Se tomó las muestras de hojas número tres a los 6, 9, 12, 15 días post inoculación (dpi) usando nitrógeno líquido y luego fueron almacenadas a -80°C para los análisis moleculares. Luego de 15 dpi todas las plantas fueron evaluadas para determinar el grado de infección del *M. fijiensis* en las hojas dos y tres de acuerdo a Alvarado que es una modificación de la escala de Fullerton and Olsen.

Para el segundo ensayo se usaron las Variedades 'Tuu Gia' (resistente) y 'Williams' (Susceptible), a diferencia del primer ensayo el objetivo de este solo fue para determinar el grado de infección del patógeno a partir de los 15 dpi.

Antes de la inoculación primero se obtuvo una suspensión de conidios con cepas de *M. fijiensis* provenientes del banco de cepas del CIBE - ESPOL, las cuales fueron recolectados en distintas provincias del país.

Las muestras de hojas recolectadas sirvieron para los análisis moleculares, mediante la extracción de ARN, síntesis de ADNc, y la PCR semicuantitativo.

A los 26 días después de la inoculación se recolectaron muestras de 1 cm<sup>2</sup> para realizar un conteo de estomas penetrados por el hongo patógeno; observándose que existen diferencias significativas en la hoja tres entre '*Calcutta-4*' y '*Williams*'.

También se determinó la expresión de 19 genes mediante una RT-PCR. Se caracterizó la expresión de cuatro genes mediante una RT-PCR semicuantitativo, observando la relación de expresión entre la variedad inoculada resistente ('*Calcutta-4*') con su control (no inoculado); la muestra de la variedad resistente inoculada con la muestra de la variedad susceptible ('*Williams*') inoculada; la muestra de la variedad susceptible inoculada con su control. El análisis de RT-PCR semicuantitativo muestra una sobre expresión en los cuatro genes al llegar a los 15 dpi, en la relación de la muestra de la variedad resistente inoculada con la muestra de la variedad susceptible inoculada.

Todos los genes se analizaron con herramientas bioinformáticas, en distintas bases de datos, realizando un blastx y blastn con secuencias de ADNc, en el cual se logró identificar el E – value del organismo del cual tiene mayor semejanza y así mismo la proteína a cual codifica.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	VI
ÍNDICE GENERAL .....	VIII
ABREVIATURAS.....	X
SIMBOLOGÍA.....	XII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	XVII
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	5
1. GENERALIDADES .....	5
1.1 Banano.....	5
1.1.1 Importancia económica del banano en el Ecuador.....	8
1.1.1.1 Principales sectores de producción.....	11
1.1.2 Principales enfermedades del Banano.....	12
1.1.3 Variedades susceptibles y resistentes a la sigatoka negra. ....	16
1.2 La Sigatoka negra.....	17
1.2.1 Taxonomía del agente causal .....	17
1.2.2 Ciclo de la enfermedad y epidemiología.....	18
1.2.3 Distribución e importancia económica.....	21
1.2.3.1 Importancia económica en Ecuador.....	24
1.2.4 Síntomas de la enfermedad en banano.....	25
1.3 Interacción Planta – Patógeno .....	26
1.3.1 Mecanismo de defensa de las plantas. ....	29
1.3.2 Diálogo celular en la interacción planta – patógeno. ....	32
1.4 Mecanismos de resistencias en plantas .....	33
1.4.1 Genes de Resistencia. ....	34
1.4.2 Sistema Adquirido de Resistencia.....	35
CAPITULO 2 .....	38
2. METODOLOGÍA.....	38
2.1 Bioensayos. ....	38
2.1.1 Materiales y ubicación.....	38



2.1.2	Variedad Vegetal.....	42
2.1.3	Diseño experimental.....	42
2.1.4	Tratamientos. ....	43
2.1.5	Evaluación.....	46
2.2	Caracterización Molecular.....	52
2.2.1	Extracción de ARN.....	52
2.2.2	Síntesis de ADNc. ....	53
2.2.3	Identificación de genes expresados. ....	55
2.2.4	Análisis bioinformático de secuencias.....	60
CAPÍTULO 3 .....		61
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
3.1	Interacción planta – patógeno.....	61
3.2	Identificación de genes. ....	74
CAPÍTULO 4 .....		96
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	96
4.1	Conclusiones. ....	96
4.2	Recomendaciones. ....	97
APÉNDICE .....		98
BIBLIOGRAFÍA .....		113

## ABREVIATURAS

ABC: Área Bajo la Curva

AP: Apresorio

ARN: Ácido ribonucleico

Avr: Avirulencia

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPA: Días Post Aplicado

DPI: Días Post Inoculación

DEPC: Diethyl pyrocarbonate

E: Etileno

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria

FHIA: Fundación Hondureña de Investigación Agrícola

HCN: Ácido cianhídrico

HR: Alta Resistencia

IITA: International Institute of Tropical Agriculture

INEC: Instituto Nacional de Estadísticas y Censo

JA: Ácido Jasmónico

MAGAP: Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y pesca

MeJA: Metiljasmonato

PAL: Fenilalanina amonio – liasa

PCR: Polymerase Chain Reaction

PR: Resistencia Parcial

PVP: Polivinilpirrolidona

R: Resistencia

SA: Ácido Salicílico

SSH: Suppression Subtractive Hybridization

## SIMBOLOGÍA

Ha: Hectárea

mM: Mili molar

M: Molar

μl: Micro litro

μg: Micro gramo

mg: Mili gramo

g: Gramo

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1.1 DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD SIGATOKA CAUSADA POR EL HONGO <i>M. fijiensis</i> O <i>M. musicola</i> .....	20
FIGURA 1.2 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet Y <i>Mycosphaerella musicola</i> Leach.....	23
FIGURA 1.3 FORMAS DE INVASIÓN Y NUTRICIÓN DE CIERTOS HONGOS DURANTE UNA INTERACCIÓN COMPATIBLE.....	28
FIGURA 2.1 INOCULACIÓN DE LAS PLANTAS DE BANANO EN EL INVERNADERO.....	45
FIGURA 2.2 DECOLORACIÓN DE TEJIDO VEGETAL CON KOH...	49
FIGURA 2.3 TINCIÓN DEL TEJIDO VEGETAL CON SOLUCIÓN SALINA DE ANILINA AZUL.....	50
FIGURA 2.4 TINCIÓN AL VACÍO DE LOS CORTES DE BANANO...	51
FIGURA 3.1 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LAS VARIEDADES 'WILLIAMS' VS 'CALCUTTA-4' EN LA HOJA # 3.....	63

FIGURA 3.2	AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LAS VARIEDADES ' <i>WILLIAMS</i> ' VS ' <i>CALCUTTA-4</i> ' EN LA HOJA # 2.....	64
FIGURA 3.3	AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LA VARIEDAD ' <i>WILLIAMS</i> ' COMPARADA ENTRE LAS HOJA # 2 VS HOJA # 3 DEL ENSAYO ' <i>WILLIAMS</i> ' – ' <i>CALCUTTA-4</i> '.....	65
FIGURA 3.4	AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LA VARIEDAD ' <i>CALCUTTA-4</i> ' COMPARADA ENTRE LAS HOJA # 2 VS HOJA # 3.....	66
FIGURA 3.5	AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LAS VARIEDADES ' <i>WILLIAMS</i> ' VS ' <i>TUU GIA</i> ' EN LA HOJA # 3.....	67
FIGURA 3.6	AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LAS VARIEDADES ' <i>WILLIAMS</i> ' VS ' <i>TUU GIA</i> ' EN LA HOJA # 2.....	68
FIGURA 3.7	AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LA VARIEDAD ' <i>WILLIAMS</i> ' COMPARADA ENTRE LAS HOJA # 2 VS HOJA # 3 DEL ENSAYO ' <i>WILLIAMS</i> ' – ' <i>TUU GIA</i> '.....	69
FIGURA 3.8	AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LA VARIEDAD ' <i>TUU GIA</i> ' COMPARADA ENTRE LAS HOJA # 2 VS HOJA # 3.....	70

FIGURA 3.9 ESTOMAS PENETRADOS POR <i>M. fijiensis</i> EN TEJIDO DE BANANO.....	73
FIGURA 3.10 EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS A RESISTENCIA A <i>M. fijiensis</i> .....	75
FIGURA 3.11 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS A RESISTENCIA A <i>M. fijiensis</i> .....	76
FIGURA 3.12 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN ESO1-B9 CON MUESTRAS DE ADNc DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A <i>M. fijiensis</i> .....	78
FIGURA 3.13 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN ESO1-C10 CON MUESTRAS DE ADNc DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A <i>M. fijiensis</i> .....	79
FIGURA 3.14 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN ESO2-A10 CON MUESTRAS DE ADNc DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A <i>M. fijiensis</i> .....	80
FIGURA 3.15 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN ESO2-A11 CON MUESTRAS DE ADNc DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A <i>M. fijiensis</i> .....	81
FIGURA 3.16 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN EF1 (ELONGATION FACTOR ONE) CON MUESTRAS DE ADNc DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A <i>M. fijiensis</i> .....	82

FIGURA 3.17 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN ESO1-B9 A LOS 6 DPI, 9 DPI, 12 DPI Y 15 DPI.....	83
FIGURA 3.18 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN ESO1-C10 A LOS 6 DPI, 9 DPI, 12 DPI Y 15 DPI.....	84
FIGURA 3.19 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN ESO2-A10 A LOS 6 DPI, 9 DPI, 12 DPI Y 15 DPI.....	85
FIGURA 3.20 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN ESO2-A11 A LOS 6 DPI, 9 DPI, 12 DPI Y 15 DPI.....	86
FIGURA 3.21 NÚMERO DE GENES ENCONTRADOS EN LOS CROMOSOMAS DE BANANO.....	92
FIGURA 3.22 UBICACIÓN DE LOS GENES EN LOS CROMOSOMAS DEL BANANO.....	93



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1	Solución modificada de Hoagland.....	Pág 39
TABLA 2.2	Cepas usadas para la inoculación artificial de <i>M. Fijiensis</i> .....	41
TABLA 2.3	Tratamientos del ensayo ‘williams’ – ‘calcutta’ 4 – <i>mycosphaerella fijiensis</i> morelet.....	44
TABLA 2.4	Grados de infección de la sigatoka negra en hojas de banano.....	47
TABLA 2.5	Temperaturas para la síntesis de ADNc con el kit gotaq 2-Step RT-qpcr System (PROMEGA).....	55
TABLA 2.6	Código de genes usados para determinar su expresión.....	57
TABLA 2.7	Protocolo de la PCR para establecer el análisis de expresión de genes.....	59
TABLA 3.1	Área bajo la curva y prueba de la normalidad de las distintas variedades evaluadas.....	62
TABLA 3.2	Número de estomas penetrados por <i>M. Fijiensis</i> en variedad resistente y susceptible de banano.....	71
TABLA 3.3	Prueba de tuckey de estomas penetrados.....	72
TABLA 3.4	Análisis bioinformático en Blast de diferentes bases de datos.....	89

## INTRODUCCIÓN

El banano es una fruta muy apetecida a nivel mundial, es originaria de Asia austral (Indomalaya). En el siglo XV llegó a las islas Canarias, desde allí comenzó su distribución a América en el año 1516, actualmente hay aproximadamente 500 variedades de las cuales no todas son apetecibles. Ecuador es uno de los principales exportadores de banano a nivel mundial debido a la cantidad de superficie plana con la que cuenta y su clima tropical, en el 2011 se generó \$260 millones de dólares como impuesto al estado, siendo el banano el segundo producto de exportación de mayor importancia luego del petróleo [1-3].

Este cultivo se ve afectado por algunas enfermedades, la sigatoka negra es una de las de mayor importancia a nivel foliar, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. un hongo ascomiceto heterotálico capaz de reducir enormemente la actividad fotosintética de la planta, y puede causar una pérdida del 100% en la producción y un incremento en el costo, obteniéndose una gran cantidad de racimos pequeños y una maduración precoz, lo cual impide su exportación [4-6].

Esta enfermedad fue reportada en 1963 en las islas Fiji y luego se extendió a lo largo del Pacífico, en 1989 se la detectó en Ecuador en la zona norte, específicamente en la provincia de Esmeralda, luego se distribuyó a lo largo de las bananeras del país, en ese entonces los controles fitosanitarios para esta enfermedad no eran muy eficientes [7, 8].

Actualmente existen varios controles para la sigatoka negra, lo cual constituye el 27% del costo total de la producción, el método de control más usado es el control químico mediante el uso de fungicidas, pero una desventaja de este tipo de control es que *M. fijiensis* desarrolla resistencia a ingredientes activos como Benzimidazoles, Triazoles y Estrobirulinas, causando problemas al medio ambiente y a la salud humana. El control cultural es un método amigable al medio ambiente pero la efectividad no se ve reflejada en grandes extensiones del cultivo [6].

Existen variedades que son resistentes a *M. fijiensis* tales como 'Tu'u Gia' y 'Calcutta-4' [9]. Hay organismos privados que siguen un programa de mejoramiento clásico para desarrollar híbridos que sean resistentes a enfermedades, tales como FHIA, EMBRAPA, IITA, pero comercialmente estos híbridos no han tenido mucho éxito, debido a que el sabor del fruto es muy diferente al de los que normalmente se cultivan del subgrupo Cavendish. Se han usado herramientas como la ingeniería genética, para crear plantas transgénicas; sin embargo este tipo de cultivares aun no son aceptados por el debate e interrogantes ecológicas y sociales. Una posible alternativa que podría permitir el uso de estas plantas transformadas genéticamente, sería mediante el uso de generaciones de cisgénicos, que son organismos modificados genéticamente, pero los genes usados pertenecen a la misma especie [10, 11].

Hay estudios donde se han logrado identificar genes resistentes a enfermedades, como es el caso del gen *ATAF1* encontrado en *Arabidopsis*

*thaliana* L. que se sobre-expresa en estrés biótico y abiótico y se lo ha logrado insertar en arroz (*Oryza sativa* L.) debido a que este gen hace tolerante al cultivo en sequía y salinidad y también actúa como como inhibidor de la enfermedad causada por *Botrytis cinérea* Pers [12, 13]. Por otro lado otros estudios han demostrado que el gen *MfAvr4* que es un efector en el tomate en el patógeno *Cladosporium fulvum* al ser transferido en el banano otorga una resistencia cuando se encuentra en interacción con *M. fijiensis* el mismo que es homólogo al gene del tomate *Cf-4* que desencadena una respuesta hipersensible en él [14, 15].

El presente trabajo de investigación estudia la interacción planta – patógeno, en banano – sigatoka negra, para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

1. No hay una expresión diferenciada de genes candidatos a resistencia en variedades resistentes y susceptibles.
2. No existen diferencias en el grado de infección causado por *M. fijiensis* en bioensayos realizados en invernadero en variedades resistentes y susceptibles.

VARIABLES EVALUADAS:

La variable en la primera hipótesis fue la determinación de expresión génica mediante un análisis de PCR semicuantitativo. En la segunda hipótesis fue la evaluación semanal del grado de incidencia de la sigatoka negra en las hojas # 2 y 3. Para validar las hipótesis se estableció el siguiente objetivo general.

Identificar genes candidatos para resistencia a sigatoka negra en banano.

Objetivos específicos.

Estudiar la interacción planta – patógeno en banano – sigatoka negra mediante bioensayos en invernadero.

Evaluar la severidad de la enfermedad en variedades susceptibles y resistentes.

Determinar la expresión en genes candidatos en variedades susceptibles y resistentes.

# CAPÍTULO 1

## 1. GENERALIDADES

### 1.1 Banano

Los bananos (*Musa spp*) son oriundos de la región Indomalaya, donde se encuentra gran parte de las especies del genero *Musa*. Los miembros de este género pertenecen al orden Zingiberales y a la familia de las Musáceas y crecen mejor en ambientes con alta humedad. Las plantas de banano llegan alcanzar una altura de 2 a 3 m, con un diámetro del pseudotallo de 20 cm en promedio, conformado por las vainas de las hojas. El tallo es un corno subterráneo con una estructura cónica asimétrica y eje central curvo, del cual brotan raíces y yemas vegetativas. Las hojas nuevas están presentes como rollos apretados en el pseudotallo

que deben abrirse paso para que salga la lámina foliar. Las láminas de las hojas puede alcanzar a medir hasta unos 5 m de largo por 1 m de ancho. El tallo floral aparece cuando se han producido alrededor de 20 hojas adultas, la inflorescencia está conformada por cimas protegidas por brácteas con un contorno cilíndrico en la parte superior, su fruto es alargado de forma cilíndrica, sin semillas y de piel amarilla cuando está maduro. El lugar óptimo para desarrollarse es en climas tropicales, siendo difícil en áreas donde las temperaturas son menores a 15°C y donde la lluvia anual es menor a 2000 mm [7, 9, 16, 17].

Existen tres factores importantes en la evolución del banano, que han transitado simultáneamente tales como poliploidia, esterilidad y partenocarpia, además se complementa la selección por el hombre y la propagación vegetativa [16, 17]. Al inicio de la evolución del banano solo se conocía las especies *M. acuminata* y *M. balsiana* endémico del sur-este de Asia, estas dos especies se cruzaron y formaron híbridos que han sido los principales predecesores de las especies de *Musa* comestibles, ambas especies son diploides, el genoma silvestre de *M. acuminata* es representado como AAw y de *M. balsiana* BBw. Las especies triploides también han formado parte importante en la evolución, se encuentran en los grupos genómicos AAA, AAB y ABB, y se diferencian de las diploides por el pseudotallo, ya que los variedades triploides son más esbeltos y sus frutos más grandes. En total se han logrado identificar 9 grupos genómicos

de las combinaciones de *M. acuminata* y *M. balsiana* AA, AAA, AAAA, AB, AAB, ABB, AAAB, AABB y ABBB [9].

El cultivo del banano es de gran importancia en todo el mundo, los clones africanos se los encuentra en la región indomalaya, los cuales llegaron por medio de dos vías, India-Golfo Pérsico- Arabia- África Oriental, extendiéndose por todo el continente. En América fue introducido después de la conquista de 1516, Fray Tomás Berlanga llevo algunas cepas a Santo Domingo ese mismo año, y fue aceptado por los indígenas, luego hubo una dispersión rápida por toda la región adelantándose de los conquistadores [17].

Existen dos métodos para el manejo del banano, el convencional, en el cual se rige en el uso de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades y obtener una buena producción, la gran parte de las extensiones bananeras se basan en este método, pero también se lo puede realizar de forma orgánica, aunque este método es más amigable con el medio ambiente el rendimiento comparado con el método convencional es mucho menor, existen clones como '*Valery*' o '*Gran Naine*' que no han sido probados bajo manejo orgánico en los trópicos, salvo las experiencias de pequeños productores que reportan que su producción anual no es muy elevada [18, 19].

Hay muchos estudios que intentan reducir el uso indiscriminado de agroquímicos, se ha trabajado en la mejora de variedades resistentes a



plagas y enfermedades, por este motivo se han creado híbridos que han sido introducidos en los mercados tradicionales tanto de bananos como de plátanos, que han ayudado a reducir el impacto ambiental [18-21]. Hay herramientas biotecnológicas que permite realizar un mejoramiento de la planta de banano, por ejemplo, la ingeniería genética, que se usan técnicas para obtener plantas transgénicas o cisgénicas que llevan a reducir enormemente el uso de agroquímicos, pero existe una disputa para que este tipo de mejoramiento sea abiertamente usado en muchos países del mundo [11, 22, 23].

### **1.1.1 Importancia económica del banano en el Ecuador.**

A partir del origen del Banano en los continentes de Asia y África, este es trasladado a América por medio de las corrientes migratorias que se han agrupado con la dispersión de las personas de ese continente, desde aquel entonces el banano se desarrolló de forma natural y silvestre en las zonas donde mejor se han adaptado, como la región tropical. Desde el siglo XX se comenzó a recopilar datos estadísticos de la producción bananera en el Ecuador, que había venido generando un excedente en el consumo interno del cual comienza su exportación. Chile y Perú fueron los primeros países a los que se comenzó a exportar en los años de 1910, la razón fue porque el periodo de maduración del fruto coincidía con el tiempo que demoraba el envío, dado a que en aquel periodo aún no había

facilidades de enfriamiento y técnicas para que se pudiera permitir un tiempo mayor previo a su maduración. En este mismo año se logró exportar 71.000 racimos por 59.000 sucres y en 1950 se produjo 6 millones en 610.00 racimos, el desarrollo de la actividad bananera en el Ecuador tomó 40 años [24-26].

En el gobierno del Presidente Galo Plaza Lasso hubo una expansión de los cultivos y en 1948 que fue cuando asume la presidencia, Ecuador ya exportaba 3.8 millones de racimos y al final de su periodo presidencial en 1952 llegó a los 16.7 millones por lo tanto en ese entonces hubo un crecimiento del 421%. Lasso consiguió que el Ecuador fuera el principal país exportador de Banano del Mundo, “En mi gobierno hubo planificación. Prueba de eso por ejemplo, el caso del banano. En 1948, Ecuador ocupaba el puesto 27. Para el año 1951 nos convertimos en el primer exportador del mundo”, fueron palabras que mencionó el presidente Lasso en su periodo de gobierno [3, 24].

Entre los años de 1985 y 2002 el Ecuador ha sido el mayor exportador Bananero del mundo y su comercio ha ido acentuándose, las exportaciones crecieron de un millón de toneladas a 3.6 millones de toneladas lo que equivale 9% del índice medio anual, el cual fue el más elevado entre los cinco países exportadores de relevante importancia, esto se debe a que el Ecuador cuenta con mayor

superficie plana y en menor medida por el crecimiento de la producción por hectárea. [2, 27].

El Ecuador Consta con una diversidad de sistemas de la actividad bananera, algunas fincas cuentan con unas amplias adecuaciones para el manejo y producción de este cultivo, como sistemas de drenajes, cable vías, riego, y mano de obra que representa una persona por hectárea mientras que otras fincas solo son de secano y utilizan pocos insumos, además que sus sistemas de drenaje son muy ineficaces y pueden llegar a emplear hasta 5 trabajadores por hectárea [2].

En el año 2011 el Ecuador exportó 284 millones, 590 mil 787 cajas, lo que representó \$260 millones de dólares como impuesto al estado, convirtiéndose el cultivo de banano como el primer producto agrícola de exportación del país y el segundo de mayor importancia luego del petróleo, la cantidad de cajas exportadas constituye el 2.5% del PIB total y el 23% de la exportaciones privadas del país, en el 2012 se exportó 248 millones, 840 mil, 362 cajas, disminuyó en comparación al año anterior y las 5 principales exportadoras de banano fueron Ubesa (10.29%), Truisfruit (7.44%), Oro Banana (5.41%), Bagnilasa (4.72%), Comersur (4.15%) y sus principales mercados fueron Mar del norte/Báltico (23.39 %), Rusia (22.51%), Estados Unidos (15.44%), Mediterráneo (12.05%), Cono sur (7.75%) [2, 3, 28, 29].

Existen Industrias que dependen más del 60% del sector bananero las cuales realizan importantes inversiones en áreas como: cartoneras, plásticos, transporte terrestre, certificadoras, verificadoras, agroquímicas, fumigación, navieras, fertilizantes, productora de meristemas, entre otras. Todas estas industrias son muy importantes y generan trabajo a millones de personas [3].

#### **1.1.1.1 Principales sectores de producción.**

Ecuador es un país megadiverso, con una excelente condición climática y ecológica, lo cual hace posible que muchos agricultores tanto pequeños, medianos y grandes puedan producir banano durante todo el año. Según datos del INEC en el 2011 la superficie plantada es de 200.110 Ha y en el año 2010 la superficie fue de 235.773 Ha de banano sembradas, lo que hace referencia a que ha habido una disminución en la superficie de Ha de banano sembradas por diversos factores de producción bananera [30].

Las principales provincias productoras son El Oro con 49.129,50 Ha. Sembradas inscritas, Guayas con 50.719,04 Ha. Y Los Ríos con 56.045,88 mientras que el resto de las provincias en conjunto cuentan con 15.002,02 Ha [31].

Según el Programa Nacional del Banano el sector bananero de nuestro país se encuentra distribuido por la zona norte

comprendida por Esmeralda, Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas, La zona Central comprendida por Los Ríos, Cotopaxi, Guayas, La zona Oriental con la provincia del Guayas, La zona sur con la provincia de El Oro [32].

### **1.1.2 Principales enfermedades del Banano.**

El banano es una planta herbácea susceptible a muchas enfermedades dependiendo la variedad, Muchas de estas afectan a distintos órganos y tejidos de las plantas, tales como las causadas por hongos que afectan a raíz, pseudotallo, hojas, frutos. Otros microorganismos también suelen ser muy perjudicial para este cultivo, como es el caso de las bacterias, nemátodos, virus.

En Ecuador existen algunas enfermedades de gran importancia económicas causadas por hongos a nivel foliar, pseudotallo, cormo, raíz, tales como:

La Sigatoka Negra (*M. fijiensis*) es considerada como una enfermedad en 1963 en Fiji en el valle de Sigatoka, es la enfermedad de mayor importancia económica a nivel foliar, afecta a plantas de banano de distintos genotipos debido a que es muy virulenta, cuando no se conocía a fondo el ciclo de vida y la forma de infectar a la planta, esta causo muchas defoliaciones en grandes extensiones de banano cultivado en distintas partes de mundo. Cuando este hongo ataca la planta se ve afectada en el área foliar y en la productividad,

obteniéndose racimos pequeños de bajo peso y disminuyendo la actividad fotosintética causando una maduración precoz de sus frutos que impiden su exportación [5, 7, 33].

Se diferencia de la sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach) por los conidios y conidióforos, además por los síntomas que se pueden notar en la planta. [5, 34]

Los síntomas de *M. fijiensis* son notables a simple vista desde los primeros estadios en el envés de la hoja, comienzan con unos pequeños puntos rojizos hasta formarse la estría y luego cubrir toda la hoja. La mayor parte de los Bananeros controlan la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) mediante aplicaciones de fungicidas sistémicos como los Benzimidazoles y Triazoles, aunque cada vez más se reporten resistencia a varios productos del mercado debido a que las poblaciones de este hongo presenta una alta variabilidad genética y patogénica. [5, 33, 35].

El mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*) Se trata de una de las enfermedades de banano más destructivas, se estima que en el año de 1960 había destruido aproximadamente 40,000 ha de 'Gros Michel' (AAA), a causa de este considerable daño es considerada como la enfermedad más catastrófica de todas las enfermedades de banano, ingresa por medio de las raíces e invade el xilema pudiendo causar la muerte del hospedero [7, 36].

*Fusarium oxysporum* también ataca a plantas comerciales como tomate, melón, rábano, café, achiote, etc, causando marchitez

vascular, inclusive se ha usado este hongo para tratar de acabar con plantaciones de coca en Colombia. Este hongo cosmopolita existe en diversas formas patogénicas y se conoce que afecta a plantas Angiospermas y Gimnospermas por los mecanismos que tiene este hongo para romper la defensas de las plantas [37].

Se presenta como saprofito en el suelo, dependiendo el tipo de hospedante es posible que se distingan razas fisiológicas, produce 3 tipos de esporas; las microconidias son esporas unicelulares, conidióforos pocos ramificados, carecen de septas, las macroconidias son esporas con paredes delgadas, moderadamente curvadas en forma de hoz, y las clamidosporas se forman por medio de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias [37].

Unas de las enfermedades importantes causada por bacterias es el Moko (*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al), provocando amarillamiento en las hojas, marchitamiento, y muerte de la plantas. En 1890 importantes pérdidas se reportaron en Trinidad pero probablemente se había presentado en América del sur [7, 38, 39]. La forma de contaminación por esta bacteria es principalmente a través de insectos que han estado en frutos enfermos o susceptible y trasladan la fuente de inóculo a plantas que están sanas, otro medio de contaminación es cuando el suelo y agua están afectados, las malezas suelen ser muy buenos hospederos de la bacteria [40-42].

Por otro lado otra especie bacteriana de importancia es la *Erwinia spp*, causante de pudriciones en el pseudotallo, cormo y rizoma, por ejemplo *Erwinia carotovora* y *Erwinia chrysanthemi* son bacterias que invaden el rizoma después de ser plantadas introduciéndose por medio de heridas o algunas hojas en descomposición. Suelen presentarse principalmente en ambientes húmedos o en suelos contaminados pocos drenados [7].

La presencia de virus en banano ha llegado a que grandes extensiones cultivadas se pierdan en diversas variedades del subgrupo Cavendish, Banana Bunchy Top Virus (BBTV) es considerada como el virus más devastador sobre el cultivo de banano, fue detectado por primera vez en Fiji en 1889 aunque también existen otros como Banana Streak Virus (BSV), Banana Mosaic Virus (BMV), Banana Mild Mosaic Virus (BMMV), Banana Dieback Virus (BDV) La gran mayoría de los virus son transmitidos por áfidos presentando como síntomas en las plantas malformaciones en las hojas, amarillamientos y rayados, sus síntomas se pueden confundir con falta de nutrientes de la plantas [7].



### 1.1.3 Variedades susceptibles y resistentes a la sigatoka negra.

Se conoce que la sigatoka negra y la sigatoka amarilla son enfermedades de gran importancia económica en cultivos de banano y plátanos, provocan un déficit en la producción debido a que estos hongos afectan al crecimiento vegetativo, disminuyen la actividad fotosintética, por lo cual la disminución de racimos en la planta se ve muy afectada y pueden causar pérdidas considerables en el cultivo [43].

La sigatoka negra ha sido de gran importancia tanto en banano y plátano de variedades susceptibles. En 1989 existían más de 40 mil Ha de plátanos con genotipo (AAB) y aproximadamente 14.000 eran Cavendish que estaban en protección. En 1991 se realizaban 20 ciclos /año de fumigación en plantaciones de banano Cavendish, luego en 1993 se comenzó a introducir nuevos clones como 'FHIA' y se realizaban estudios en Cuba en los años 2000 y 2003 en tres distintas regiones para probar la resistencia de estos híbridos. Se determinó los componentes de resistencia tomando en cuenta el área foliar afectada, velocidad de evolución de la enfermedad, tiempo de incubación y transformación de rayas a necrosis, para ello se usaron clones como 'FHIA 23', 'FHIA 21', 'FHIA 02', 'FHIA 18', 'Yangambi Km 5', 'Gran enano' y se comparó la agresividad de aislamientos de *M. Fijiensis* procedentes de plantaciones 'FHIA 18'. Los resultados de dichos ensayos mostraban que mientras el 'Gran enano'

manifestaban a la cosecha una sola hoja funcional en planta madre los clones exhibían entre 7 y 10 hojas funcionales y el ciclo de transición de rayas fue entre 1.7 y 2.7 veces más largo en los clones híbridos que en el Gran enano y la producción de pseudotecios en las manchas foliares fue entre 5 y 20 veces menor [33, 44].

De la misma manera, se han probado otras variedades resistentes a *M. fijiensis* como es el caso de 'Tuu Gia' (AA) y 'Calcutta-4' (AA), y se ha reportado que la respuesta a la defensa de estas variedades se activan tan pronto el patógeno ingresa a los estomas [9, 45, 46].

## **1.2 La Sigatoka negra**

### **1.2.1 Taxonomía del agente causal**

*M. fijiensis* es un ascomiceto heterotálico con un ciclo en su reproducción sexual y asexual, causante de la Sigatoka negra, esta enfermedad fue descubierta por primera vez por Leach (1964), Inicialmente los conidióforos se encuentran como manchas café en la zona inferior de la hoja y luego continua al segundo estadio (Stover 1963) [7].

**División:** Ascomycota

**Clase:** Dothideomycetes

**Orden:** Capnodiales

**Familia:** Mycosphaerellaceae

**Género:** *Mycosphaerella*

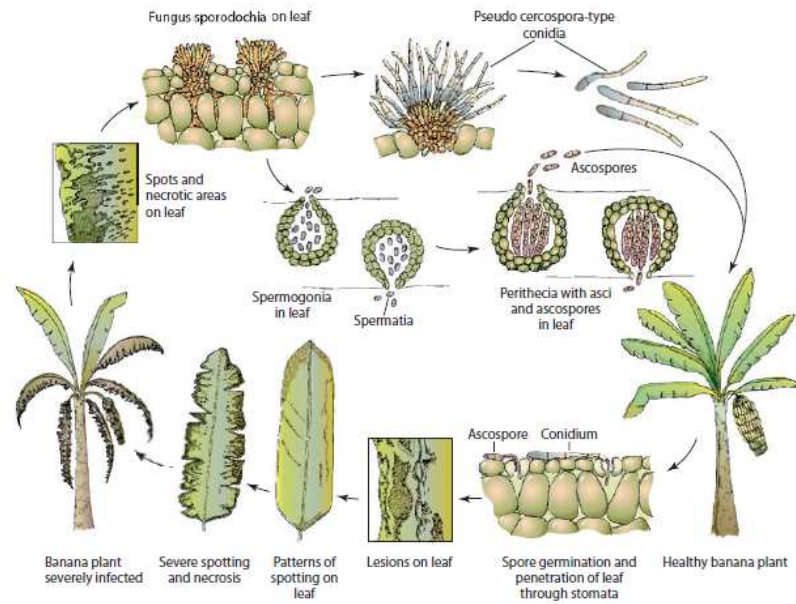
**Especie:** *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

### 1.2.2 Ciclo de la enfermedad y epidemiología.

Un factor importante para la infección tanto de *M.fijiensis* como de *M.musicola* son las condiciones climáticas, comienza con esporas sobre la hoja susceptible de banano que han sido dispersas por el agua y viento , éstas esporas comienzan a germinar en un rango de 2 a 3 horas, para que esto suceda el hongo necesita de una humedad y temperatura optima, para *M.fijiensis* la temperatura para la producción de conidios está entre 25 - 29°C y para las ascosporas está entre 25 - 26°C, el hongo comienza a crecer antes de que penetre por los estomas de la hoja, cuando está dentro esta forma una hifa subestomática de gran tamaño, las cuales crecen a través de las capas del mesófilo en cámaras de aire [47, 48].

El tiempo que transcurre desde la germinación de espora y la aparición de síntomas es de 17 días. A los 28 días ya se encuentran los primeros conidios que se forman sobre lesiones en el estado estría, cuando ocurre la finalización del ciclo de vida se comienza con la liberación de las primeras ascosporas, la cual puede acontecer 49 días después de la infección en campo [48].

Los ciclos de vida de *M. fijiensis* y *M.musicola* son muy similares, con la diferencia que *M. fijiensis* produce esporodoquios en etapa temprana y sus hifas se dispersan de estoma en estoma, ambos producen espermacios, ascosporas en peritesios y conidios del tipo Pseudocercospora [49].



**FIGURA 1.1 DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD SIGATOKA CAUSADA POR EL HONGO *M. fijiensis* O *M. musicola*.** La infección por conidios o ascosporas producen el mismo tipo de mancha, seguido por el desarrollo de la enfermedad [49].

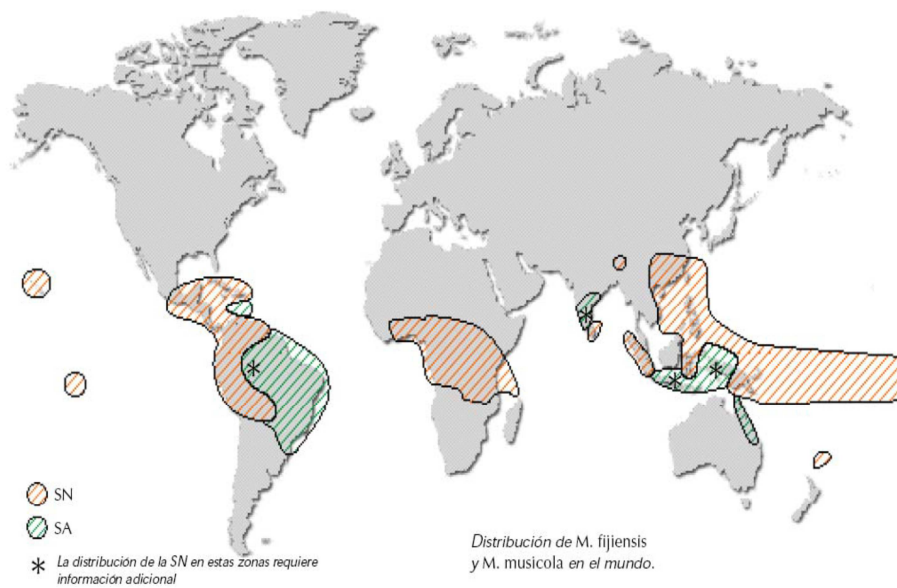
Fuente: Agrios, Plant Pathology.

### **1.2.3 Distribución e importancia económica.**

En Asia y el Pacífico La sigatoka negra fue reportada por primera vez en febrero del 1963 en Sigatoka Valley de Viti Levu en las islas Fiji, entre 1964 y 1967 se mostró que la enfermedad se extendió en el Pacífico. La enfermedad también ha estado presente en el Estado Federado de Micronesia, Nueva Caledonia, Papua Nueva Guinea, Philipinas, Samoa Occidental, Tahití, Taiwán, Malasia oeste. En 1969 se identificó la Sigatoka negra en las islas de Hawaii y se reportó la presencia de la enfermedad en otros lugares del pacífico. En África los reportes comenzaron en Zambia en 1973, los síntomas se parecían a los de la Sigatoka negra pero aún no se podía confirmar con muestras enviadas de UK, el primer reporte auténtico fue en Gabon en 1978, se creyó que la enfermedad podía haber sido introducido de materiales de siembra provenientes de Asia, sin embargo reportes de síntomas habían sido observados en São Tomé 1978 [7].

En América latina y región del caribe se comenzó a dar reportes de la enfermedad cuando apareció por primera vez fuera de Asia y el Pacífico, a partir de aquí esta enfermedad adquirió el nombre común de Sigatoka Negra. Lentamente la enfermedad se movió a lo largo América Latina, en 1981 fue endémica de América Central, luego se movió al sur de América en los países como Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. En 1981 La sigatoka negra estuvo presente en todos

los países entre el sur de México y Panamá, sin embargo en 1981 la enfermedad alcanzó zonas de las principales exportaciones bananera en tierras bajas de Colombia, donde todas las plantaciones de banano fueron atacadas, luego la enfermedad se esparció a lo largo del Pacífico y costas del Atlántico de Colombia donde las plantas crecen en asociación con el café. En Ecuador la enfermedad fue detectada en 1987 en la zona norte del país en la Provincia de Esmeralda y en 1989 fue encontrada en áreas de producciones bananeras como Los Ríos y Guayas y luego de 3 años apareció en la provincia de El Oro situada al sur del país, es decir la enfermedad tardó aproximadamente 5 años en afectar a todas las bananeras del País [7, 8, 47].



**FIGURA 1.2 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE *Mycosphaerella fijensis* Morelet Y *Mycosphaerella musicola* Leach. SN=Sigatoka Negra, SA=Sigatoka Amarilla**

FUENTE: Mourichon y Fullerton.



### 1.2.3.1 Importancia económica en Ecuador.

Se conoce que en el año 2003 Ecuador contaba con aproximadamente 150.000 Ha de banano cultivado, se encontraban ubicadas en el litoral, principalmente en las provincias de Los Ríos, El Oro y Guayas con tecnologías bajas para el control de *M. fijiensis*, La variabilidad del clima en distintos sectores del país ha provocado que la sigatoka negra adquiriera un comportamiento muy diverso, en ese año se reportó que la enfermedad fue más severa en Los Ríos y menos en El Oro, luego de dos años la situación se invirtió. Cuando ocurrió la corriente del niño en Ecuador en el año de 1998 la sigatoka negra se tornó muy agresiva y a causa de este problema todos los programas fitosanitarios para el control de la enfermedad no fueron eficientes, perdiendo una gran producción de racimos y provocando una economía grave de los productores bananeros [8].

Antes que suceda el fenómeno del niño en el país en 1996 el control de la sigatoka negra era muy fácil, los ciclos de fumigación al año en la provincia de Los Ríos se realizaban entre 25 – 29 ciclos/Ha/año, en Guayas entre 20 – 24 ciclos/Ha/año y en el Oro de 12 – 16 ciclos/Ha/año, pero en el 2000 los ciclos en Los Ríos fueron disminuyendo llegando

hasta 15, mientras que en El Oro fueron aumentando, ya en el 2002 llegó a 18 ciclos/Ha/año [7, 8].

En Ecuador en el 2012 El Ministerio de Agricultura Ganadería y Acuicultura y Pesca (MAGAP) ha realizado apoyos para el control de la enfermedad, distribuyendo productos químicos como Fungicidas, Fertilizantes foliares, y capacitando a los agricultores de distintos sectores de producción bananera [50].

#### **1.2.4 Síntomas de la enfermedad en banano.**

Los síntomas de la sigatoka negra pueden variar de acuerdo con el estado de desarrollo de la planta y la severidad del ataque, ya que dependiendo las condiciones desfavorables del hongo los síntomas suelen confundirse con la sigatoka amarilla. En muchas variedades susceptibles la sigatoka presenta una gran cantidad de estrías y manchas de color café y negro, la enfermedad puede evolucionar en diferentes estados [48].

Los síntomas comienzan con manchas pequeñas de color amarillo o con rayas paralelas a las nervaduras de las hojas o en el envés del limbo, a diferencia de la sigatoka amarilla donde se lo logra reconocer en el haz, luego las manchas obtienen un tamaño de 1 a 2 cm de largo y conforme pasa el tiempo las manchas siguen

creciendo formando lesiones necróticas con halos amarillos y con un centro gris claro, estas lesiones negras son tejidos muertos que conforme avanza la enfermedad los puntos adyacentes se unen para formar tejido muerto más grandes, provocando una reducción en el rendimiento y una desnutrición en algunas hojas, teniendo como consecuencia una maduración temprana en los frutos [49, 51].

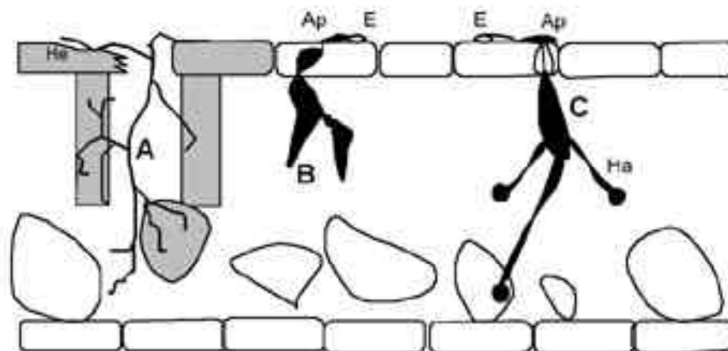
### **1.3 Interacción Planta – Patógeno**

Agrios definió que “una planta está sana o en condición normal cuando ésta puede cumplir con todas las funciones fisiológicas y dar lo mejor de su potencial genético” [52].

Existen varias clases de asociaciones para la interacción planta – patógeno, estas penden de una gran parte del contenido genético de cada organismos, debido a que todas las plantas siempre se mantienen en contacto con muchos de ellos, interactuando bajo condiciones de la naturaleza, Las plantas por cierta parte se suelen mantener sanas debido a los mecanismos de defensa con las que cuenta. En 1980 Browning mencionó que “la susceptibilidad y la resistencia son los extremos de un continuo y que la inmunidad es absoluta”, algunos genes que estipulan ciertas resistencias oligogénica y susceptibilidad se complementa a la virulencia y avirulencia en el organismo patógeno [53, 54].

Se conoce que algunos patógenos atacan a las plantas debido al desarrollo evolutivo que han tenido, como la capacidad de prescindir de algunas sustancias que producen los hospedantes de los cuales muchos dependen de estas sustancias para sobre vivir y para acceder a ello deben ingresar al protoplasmas de las células vegetales, a travesar las barreras como la cutícula de la planta y paredes celulares, por otro lado el contenido celular no siempre está en una forma disponible para el patógeno y deben ser transformados un compuestos más simples para que el patógeno lo pueda absorber y asimilar. Las plantas obtienen su defensa produciendo algunas estructuras y sustancias químicas que impiden el ingreso del patógeno, la gran parte de ellos que logran ingresar a la planta es por la fuerza mecánica que ejercen sobre la pared celular del hospedero [49, 52].

Algunos patógenos que son capaces de desarrollarse y reproducirse en el tejido de los hospedantes vivos son llamados biótrosos o también llamados parásitos obligados [52, 53].



**FIGURA 1.3 FORMAS DE INVASIÓN Y NUTRICIÓN DE CIERTOS HONGOS DURANTE UNA INTERACCIÓN COMPATIBLE.** A- Penetración por heridas (He) de un hongo necrótrofo. B- Hongo biótrofo intracelular con penetración directa mediante un apresorio (Ap). C- Hongo biótrofo intercelular con penetración por estomas y usando haustorios (Ha) para absorber los nutrimentos.

FUENTE: Ordeñana, K. (2002)

La interacción entre *Musa spp* – *M. fijiensis* depende del tipo de especies para el patógeno y a nivel de la variedad para el hospedante, lo que expresa un modelo de susceptibilidad la cual varía en la resistencia parcial (PR) Y alta resistencia (HR), por ejemplo *M. fijiensis* siendo el patógeno en una variedad susceptible, inicia su penetración a través de los estomas y esparciéndose de una forma intercelular, obteniendo una nutrición biotrófica durante un tiempo de 3 a 4 semanas. Cuando hay una resistencia parcial en una variedad existe una serie de compuestos

fenólicos especializados, la cual se almacenan en células del parénquima. Por otro lado los fenotipos que muestran alta resistencia está ligada a una inducción rápida de mecanismos de defensa, provocando una muerte rápida a las células huésped de la planta en los lugares de la infección, estas se encuentra en las interacciones incompatibles de planta – patógeno [46, 54].

### **1.3.1 Mecanismo de defensa de las plantas.**

Las plantas contienen una serie de mecanismos de defensa que son activadas por los ataques de patógenos en condiciones desfavorables, estos mecanismos pueden ser constitutivos que facilitan de forma pasiva resistencia contra los patógenos, también son llamados preformados y estos se dividen de la siguiente forma:

Estructurales constitutivos: es cuando existe la presencia de una cutícula gruesa, el grosor de la cutícula aumenta la resistencia a las infecciones de la enfermedad, aunque no siempre esté relacionada con el factor de resistencia, presencia de tricomas, deposición de ceras, estas ceras tanto en hojas y frutos forman una superficie que repela el agua donde los patógenos pueden depositarse y germinar. Muchas bacterias y hongos entran en la planta a través de estomas abiertos, aunque hay casos que estando cerrado ingresan como es el caso de la roya en el trigo. En algunas plantas cuando han sido

infectadas por hongos, bacterias, virus o nematodos con muchas frecuencias forman una capa de célula de corcho para detener el avance del lugar de infección [49, 53].

Las estructuras celulares también es una forma importante de defensa de la planta, estos cuentan con cambios morfológicos en la pared celular, se conoce tres tipos de estructuras, la capa externa de la pared celular de células parenquimatosas se hinchan cuando entran en contacto con bacterias la cual las atrapa y evita que se multipliquen, engrosamiento de la pared celular en consecuencia al ataque de hongos y virus, y el depósito de calosas en la superficie interna de las paredes celulares en respuesta a invasión por hongos [49, 52].

Químicos constitutivos: la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales como las plantas cianogénicas como el sorgo y la yuca que poseen una gran cantidad de ácido cianhídrico (HCN) [53].

Por lo general las plantas segregan una gran cantidad de sustancias a través de sus órganos (raíces y órganos aéreos), muchas de estas sustancias son inhibidoras a patógenos. Algunas plantas carecen de factores de reconocimiento, lo cual el patógeno no reconoce a la planta como hospedero y por lo tanto no produce enzimas o estructuras como apresorios [49].

Las plantas disminuyen el ataque de patógenos por medio de algunas estructuras que son barreras físicas y se interponen en el acceso del patógeno y por reacciones bioquímicas que tienen lugar en células y tejidos produciendo sustancias tóxicas o inhibiendo el desarrollo del patógeno. En células de las hojas o frutos jóvenes existen compuestos fenólicos y taninos en altas concentraciones provocando resistencia en tejidos jóvenes a los microorganismos patógenos, también son inhibidores de enzimas hidrolíticas, pero conforme los tejidos van envejeciendo la capacidad de inhibir a los patógenos disminuye, existen otros compuestos como las saponinas, tomatinas en el tomate y avenacina en avenas que tienen actividad antifúngicas, existen otras células vegetales que contienen enzimas hidrolíticas como las glucanasas y quitinasas que causan la degradación de la pared celular del patógeno [49, 55].

Las plantas poseen anticuerpos y las toxinas producidas por ellas frenan el proceso infeccioso, en 1941 Müller y Börger llamaron como fitoalexina a los compuestos químicos que se forman en la planta para inhibir a los microorganismos patógenos, pero que también existe en los tejidos la presencia de metabolitos secundarios que también ayudan a la defensa de invasiones microbianas [54].



### **1.3.2 Diálogo celular en la interacción planta – patógeno.**

Anteriormente se mencionó que los patógenos para poder acceder a nutrirse del tejido vivo de las plantas deben a travesar algunas barreras que son impuestas por ellas, y realizar una relación biotrófica usando mecanismos como apresorios, microhifa, haustorio, las bacterias son patógenos necróticos pero la mayoría de hongos se alimentan del tejido muerto, lo que implica que la planta se destruye por toxinas que algunos de estos patógenos segrega. Estos organismos pueden ingresar a la planta por medio de aperturas naturales como estomas, hidatodos, nectarios o lenticelas, también por heridas que pueden ser provocadas por daños mecánicos o lesiones de insectos, o de forma directa en el cual los patógenos deben ejercer una presión mecánica o por actividad enzimáticas [46, 52].

Uno de los compuestos de mayor importancia que cuentan con funcionalidad de defensa es la ruta fenilpropanoides tal como las cumarinas, ligninas, flavonoides, compuestos fenólicos y las fitoalexinas, las cuales tienen una variedad de función de tipo estructural de la planta como el desarrollo de actividad directa contra la infección de hongos y bacterias, al igual que enzimas como Quitinasas y las endo- $\beta$ -1,3-glucanasas, Peroxidasas que actúan como mecanismos de defensa en la planta [46, 55].

Mediante pruebas bioquímicas y moleculares se ha comprobado que en variedades resistentes como '*Calcutta-4*' la actividad de la enzima Fenilalanina amonía – liasa (PAL) aumenta de una forma considerable en las primeras 24 horas de post – infección en lugares donde se ha producido una infección fúngica, mientras que en variedades susceptibles como '*Williams*' la expresión de PAL se realiza a las 144 horas post infección. Las fitoalexinas son compuestos que produce la planta como resultado de una infección o de estrés químico o físico, que se acumulan en mayor concentración en variedades resistentes y tolerantes. Se componen de un grupo muy diverso, alrededor de 350 han sido descritas presentes en plantas superiores [46].

#### **1.4 Mecanismos de resistencias en plantas**

Se conoce que un microorganismos patógeno puede ser muy patogénico o poco patogénico para su hospedante dependiendo el grado de patogenicidad, esto se lo define como virulencia, de tal manera un patógeno puede ser muy virulento o poco virulento, para definir mejor en términos genéticos, virulencia es si un patógeno puede ser dañino para un hospedante o variedad y avirulento si no puede causar daño. En interacciones de planta – patógeno tomando en cuenta el nivel de especie, cuando existe resistencia del hospedante se lo conoce como resistencia no

hospedante, sin embargo a nivel de una raza – cultivar se conoce como resistencia establecida por la raza [53, 54].

#### **1.4.1 Genes de Resistencia.**

Las plantas suelen ser resistentes a muchas enfermedades debido a la interacción de los genes de resistencia (R) y los genes de avirulencia de los patógenos (Avr). Algunos genes R de varias plantas codifican a un grupo de proteínas que inhiben el crecimiento de patógenos. Los genes R codifican para receptores que de una forma directa o indirectamente van interactuando con ligandos producidos por genes de avirulencia del patógeno [56].

Se conoce que los patógenos producen una gran cantidad de señales y algunas de ellas son detectadas por las plantas, los patógenos cuentan con los genes Avr y si este producto activa una respuesta de defensa en las plantas con un gen R específico, el resultado de tal interacción es una expresión a la resistencia de la planta para el patógeno específico, pero también la planta puede manifestar una respuesta de sensibilidad al patógeno y por lo tanto se produce la enfermedad. Esta es una hipótesis determinada por H. Flor en 1947 denominado interacción gen por gen. Uno de los primeros genes de resistencia (R) aislados fue el gen Pto del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) dando resistencia a la bacteria

*Pseudomonas syringae* pv *tomato*. que expresa el gen *avrPto*. Este gen R codifica a una proteína con actividad de cinasa serina-treonina [56, 57].

Algunos genes R que codifican a proteínas poseen un dominio repetitivo ricos en leucina (RRL) otorgando resistencia a varias especies vegetales tales como el arroz (*Oriza sativa* L.) que le confiere resistencia a la bacteria *Xanthomonas oryzae ex Ishiyama*. Unas de las principales características de estos genes es que poseen una región RRL extracelular y un dominio transmembranal. Muchos patógenos a especies vegetales pueden mutar de ser avirulentos a virulentos, venciendo la resistencia de los genes R de las especies vegetales, pero las plantas pueden generar nuevas características de resistencias mediante recombinación genética para poder garantizar su sobrevivencia [56].

#### **1.4.2 Sistema Adquirido de Resistencia**

La resistencia sistemática adquirida es una respuesta propias de las plantas que se manifiestan cuando es atacada por un patógeno virulento que provoca lesiones locales hipersensibles produciéndose una resistencia local (LAR) el lugar del tejido que ha sido afectado, causando una serie de señales que son mediadas principalmente por

el ácido salicílico (SA) que es lo que induce la resistencia a la planta [53].

La respuesta específica de una planta a un inductor exógeno o endógeno resulta de una activación compleja en algunas rutas de señalización las cuales involucran a una transducción de señal hormonal endógena como el ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y el etileno (E) [52].

El JA y jasmonatos son compuestos que se derivan de las ciclopentanonas que habían sido detectados en el aceite esencial de *Jasminum grandiflorum*. los compuestos de AJ y el éster metílico es representado por el metiljasmonato (MeJA) pueden ser activados tanto por la defensa de las plantas como por situaciones de estrés que pueden ser causadas por factores biótico o abióticos . Estas moléculas (JA Y MeJA) han sido muy estudiadas como resistencia a patógenos necrotróficos [52, 58].

El etileno es una hormona vegetal que participa activamente en la regulación de algunos procesos tales como maduración de frutos, senescencia de las hojas y respuestas a una serie de agentes ambientales de estrés (frio, inundación, heridas) y de algunos ataques que son ocasionados por microorganismos patógenos o plagas [58].

Existe una amplia relación entre el JA, AS, que indican que el código de conexión podría estar activado en la misma célula, entre estas rutas de señalización se han identificado interacciones positivas y negativas. Una de las interacciones negativas se ha mostrado en plantas de tomate y papa debido a que el AS inhibe la síntesis y activación de algunos genes de respuestas de JA lo que hace referencia a respuestas a heridas, de la misma forma el JA inhibe la expresión mediada por el SA de algunos genes que codifican a proteínas RPs. Algunas plantas transgénicas sobre expresan el gen *erf1* (ethylene response factor1) y actúa como mecanismos de defensa de la planta en algunos microorganismos patógenos necrótrofos indicando que dicho gen produce una sobre activación de señalización del complejo AJ/E. Se ha demostrado que en plantas como *Arabidopsis thaliana* L. hay una cooperación en la expresión de genes de defensa del AS Y AJ/E en contra de *P.cucumerina* [52, 58].

Se ha demostrado que si se aplica Acibenzolar-S-metil (ASM) que es un inductor de resistencia en plantas este se activa si existe una infección patógena como *M. fijiensis* en plántulas de plátano 'Dominico' – 'Harton'. También se ha considerado que el Fosfito de potasio es un inductor de resistencia en estas plantas contra *M.fijiensis* [59].

# CAPITULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Bioensayos.

#### 2.1.1 Materiales y ubicación.

El estudio se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), ubicada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) campus Gustavo Galindo de la Ciudad Guayaquil – Ecuador.

Los bioensayos fueron elaborados en condiciones controladas de invernadero del mismo centro de investigación, con tres variedades de banano, la variedad '*Williams*' procedente del Banco de germoplasma del CIBE – ESPOL del área de Cultivo de Tejidos, y las variedades '*Calcutta-4*' y '*Tuu Gia*' procedente del banco de

germoplasma del International Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica.

Se realizó un manejo básico y constante a las plantas que iban a ser usadas para los ensayos lo cual constaba de los siguientes aspectos:

**Riego:** El riego se lo realizó 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) para que la planta se encuentre en óptimas condiciones al momento de ejecutar el ensayo.

**Fertilización:** Para fertilizar las Plantas de Banano se preparó un stock de la solución nutritiva de Hoagland, (Tabla 2.1). Las plantas necesitan de elementos nutritivos para tener un buen desarrollo de su ciclo de vida. La solución se aplicaba mediante fertirriego dos veces a la semana (lunes y viernes).

**TABLA 2.1**

**SOLUCIÓN MODIFICADA DE HOAGLAND**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración de la solución madre (g/L)</b>	<b>Volumen de la solución madre por L de la solución final (ml)</b>
KNO <sub>3</sub>	101.1	6
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236.16	4
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.08	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.49	1

Adaptada de Epstein, 1972



**Control de maleza:** Se realizó control manual de malezas tan pronto como estas aparecieron.

**Control de Plagas:** *Bemisia tabaci* Genn (Mosca blanca) es una de las plagas que afecta a la planta de banano en invernadero, para evitar la incidencia del insecto se realizó un control cultural, ubicando trampas de color amarillo con goma agrícola, dependiendo la incidencia también se puede realizar un control químico, con los ingredientes activos como Amitraz, Acetamiprid, Imidacloprid según las instrucciones de la etiqueta.

Las cepas que se usaron para la inoculación de *M. fijiensis* fue una mezcla de distintos aislados del banco de aislados del CIBE (Tabla 2.2). Previo a la inoculación se realizó la obtención de conidios, de acuerdo a Jiménez et al. (2007), establecido en el CIBE. Para ello los aislados debían pasar por distintos medios de cultivos, como PDA, Mycophil y medio V8.

TABLA 2.2

**CEPAS USADAS PARA LA INOCULACIÓN ARTIFICIAL DE *M. FIJIENSIS*.**

<b>Aislados</b>	<b>Procedencia</b>
RSS	Los Ríos
RSP5	Los Ríos
RSAB20	Los Ríos
EC5	Esmeraldas

Aislados procedentes del Centro de Investigaciones Biotecnológica del Ecuador.

Una vez que se obtuvo la suspensión conidial de los distintos aislados se procedió a la cuantificación realizando un conteo de los conidios con la ayuda de un microscopio de luz invertida (ZEISS modelo AXIOSKOP 2) y con la cámara de Neubauer (Boeco).

Para realizar las recolecciones de las muestras de hojas se usó nitrógeno líquido, luego se las almacenó en un congelador a -80°C (THERMO SCIENTIFIC) hasta que fueron usadas para los análisis moleculares. Para realizar el triturado de las muestras se usó un molino triturador (RETSCH modelo MM 400), adicionalmente también se usó el mortero y pistilo.

### 2.1.2 Variedad Vegetal

Para el presente estudio se usaron tres variedades de banano, la variedad que más se cultiva en el Ecuador '*Williams*' (AAA) susceptible a la sigatoka negra, de gran importancia a nivel económico [26], y la variedad '*Calcutta-4*' (AA) que está catalogado como resistente a esta enfermedad [9]. También se usó la variedad resistente '*Tuu Gia*' (AA) para el ensayo de evaluación de síntomas en invernadero.

### 2.1.3 Diseño experimental.

En este estudio el ensayo que se estableció fue a nivel de invernadero, el diseño que se usó fue un diseño completamente al azar (DCA), debido a que se lo realizó en un área controlada. Los análisis se los efectuó en laboratorio y las unidades experimentales se mantuvieron en igual condiciones.

Para la interacción planta – patógeno, (banano – sigatoka negra) se utilizaron las variedades '*Williams*', '*Calcutta-4*' y se las inoculó con *M. fijiensis*. Se establecieron 48 unidades muestrales las cuales se forman a partir de 4 tratamientos, 4 puntos de tiempo y 3 réplicas biológicas (Tabla 2.3).

Se usó el Software estadístico InfoStat versión 2012 para establecer la prueba de Shapiro Wilk y contrastar la normalidad del conjunto de datos en las pruebas realizadas de la interacción planta - patógeno. La prueba de la normalidad se la realizó de forma independiente en

el grupo de datos de las variedades evaluadas semanalmente, del cual se estableció el área bajo la curva (ABC).

#### **2.1.4 Tratamientos.**

##### **Interacción planta – patógeno**

En el ensayo 'Calcutta-4' – 'Williams' – *M. fijiensis* se usaron 48 plantas en total (Tabla 2.3), el ensayo se lo ejecutó en condiciones controladas, las plantas se inocularon con conidias de *M. fijiensis* a una concentración de 20,000 conidios/ml.

TABLA 2.3

**TRATAMIENTOS DEL ENSAYO 'WILLIAMS' – 'CALCUTTA' 4 –  
MYCOSPHAERELLA FIJENSIS MORELET**

<b>Interacción planta – Patógeno</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Puntos de recolección<sup>c</sup></b>	<b># Replicas</b>
<i>'Williams' + M. fijensis<sup>a</sup></i>	6dpi	3
	9dpi	3
	12dpi	3
	15dpi	3
<i>'Williams' Control<sup>b</sup></i>	6dpi	3
	9dpi	3
	12dpi	3
	15dpi	3
<i>'Calcutta-4' + M. fijensis<sup>a</sup></i>	6dpi	3
	9dpi	3
	12dpi	3
	15dpi	3
<i>'Calcutta-4' Control<sup>b</sup></i>	6dpi	3
	9dpi	3
	12dpi	3
	15dpi	3

<sup>a</sup> Se realizó una solución de agua destilada + gelatina al 1% + suspensión conidial. <sup>b</sup> Se realizó una solución de agua destilada + gelatina al 1%. <sup>c</sup> Punto de recolección de las muestras en días post inoculación.

La inoculación se lo realizó con la ayuda de un aerógrafo marca BADGER 306-7 UNIVERSAL, luego las plantas se las mantuvieron dentro de unas cajas de aluminio forradas con plástico transparente, como indica la FIGURA 2.1. Se realizaron tres réplicas biológicas por cada punto de recolección. Las muestras se recolectaron a los 6,

9,12 y 15 dpi (Tabla 2), en cada punto se recolectó la hoja número tres con la ayuda del Nitrógeno líquido.



**FIGURA 2.1 INOCULACIÓN DE LAS PLANTAS DE BANANO EN EL INVERNADERO.** Se lo realizó con la ayuda del aerógrafo dentro de la cámara húmeda

FUENTE: Foto tomada en el invernadero del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador – ESPOL.

También se realizó un ensayo con las variedades '*Tuu Gia*' – '*Williams*' – *M. fijiensis* para analizar el comportamiento del hongo Fitopatógeno en ambas variedades. Para ello se usó seis réplicas biológicas en cada variedad, y fueron inoculadas a una concentración 20,000 conidios/ml, y se mantuvieron bajo las mismas condiciones del ensayo '*Calcutta-4*' – '*Williams*' – *M. fijiensis*.

### 2.1.5 Evaluación

#### **Evaluación semanal de síntomas de *M. fijiensis* en plantas de banano**

En el ensayo de Interacción planta – patógeno luego de 15 dpi se realizó una evaluación semanal durante siete semanas de los síntomas de *M. fijiensis*, de acuerdo a Alvarado [66] que es una modificación de la escala de por Fullerton y Olsen [67], el cual determina una escala de 0 a 5, donde cero es la ausencia de síntomas y 5 el grado más severo de la enfermedad. (Tabla 2.4). Esta evaluación se la realizó durante siete semanas en las hojas número 2 y 3.

La temperatura dentro de las cámaras húmedas se mantenía entre 25 y 33°C con una humedad relativa superior al 90%, estableciendo las condiciones óptimas para el desarrollo del hongo patógeno.

**TABLA 2.4**  
**GRADOS DE INFECCIÓN DE LA SIGATOKA NEGRA EN HOJAS**  
**DE BANANO**

GRADO	DESCRIPCIÓN
0	Síntomas ausentes en la hoja
1	Manchas rojizas en el envés de la hoja. No hay síntomas en el haz
2	Manchas rojizas regulares o irregulares o circulares en la superficie superior de la hoja
3	manchas marrones En el haz de las hojas
4	Manchas circulares de color negro o marrón, posiblemente con halo amarillo o clorosis de los tejidos adyacentes, en la superficie superior de la hoja. Las áreas de tejido verde a veces presente.
5	Los puntos negros con el centro seco de color gris. Hoja completamente necrótico, a veces colgando

El grado de infección va de mayor a menor, refiriéndose con 0 cuando no existe síntoma al 5 dando a conocer el grado máximo de la infección, de acuerdo a Alvarado que es una modificación de la escala de Fullerton and Olsen (1995).



### **Conteo de estomas penetrados**

Para realizar el conteo de estomas que han sido penetrados por *M. fijiensis*, se realizó un corte de 1 x 1 cm en las hojas que fueron inoculadas tanto con gelatina al 1% (Control) y *M. fijiensis* y se las ubicó en cajas Tissue teck, estas muestras fueron recolectadas a los 26 días post inoculadas del ensayo de 'Williams' – 'Calcutta-4' – *M. fijiensis*.

Una vez con los cortes en las cajas, estas se las sumergió en una solución de hidróxido de potasio (KOH) concentración de 1M (FIGURA 2.2) y se la mantuvo en la estufa a una temperatura de 70°C durante 30 minutos, luego se realizaron 3 lavados con agua destilada, este proceso se lo realizó para que el tejido pierda la clorofila y poder realizar de una manera eficiente la tinción.



**FIGURA 2.2 DECOLORACIÓN DE TEJIDO VEGETAL CON KOH.**

Cortes del tejido vegetal en cajas Tissue teck sumergidas en una solución de decoloración hidróxido de potasio 1M.

FUENTE: Foto tomada por Ricardo Pacheco en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador – ESPOL, Laboratorio de Biología Molecular.

Para realizar la tinción cada corte de  $1 \text{ cm}^2$  se las colocó en tubos eppendorf de 2 ml, previamente se preparó una solución con 25 mg de Anilina azul + 50 ml de difosfato de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) y se la añadió a cada tubo con las muestras (FIGURA 2.3).



**FIGURA 2.3 TINCIÓN DEL TEJIDO VEGETAL CON SOLUCIÓN SALINA DE ANILINA AZUL.** Los cortes de tejido de los colocaron en tubos de 2 ml con la solución de anilina azul.

FUENTE: Foto tomada por Ricardo Pacheco en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador – ESPOL, Laboratorio de Biología Molecular.

Los tubos se los trasladaron a una cámara de vacío y se los mantuvo por 2 horas a una presión de 600 mmHg (FIGURA 2.4).



**FIGURA 2.4 TINCIÓN AL VACÍO DE LOS CORTES DE BANANO.**

Tinción de los cortes de banano con bomba al vacío y anilina azul a una presión de 600 mmHg.

FUENTE: Foto tomada por Ricardo Pacheco en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador – ESPOL, Laboratorio de Biología Molecular.

Cuando ya se han teñido los cortes, se realizó un conteo de los estomas que fueron penetrados por *M. fijiensis* en una área de 1 cm<sup>2</sup> usando el microscopio óptico de luz invertida a 40x, el conteo se lo realizó con la ayuda de un contador de colonias y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital marca SONY.

## 2.2 Caracterización Molecular.

### 2.2.1 Extracción de ARN

Se realizó extracciones de ARN de las muestras tomadas de la hoja número tres de todos los puntos de recolección de las plantas de banano del ensayo '*Calcutta-4*' – '*Williams*' – *M. fijiensis*.

Para realizar la extracción se usó un protocolo interno del laboratorio de Biología Molecular del CIBE (APENDICE A). Se comenzó con el triturado de la muestra con nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo muy fino y se utilizó 120 mg por cada muestra, luego se les añadió el buffer de extracción para evitar la degradación del ARN, que contiene NaCl [400 mM], Tris-HCl pH8.0 [10 mM], EDTA [2 mM], PVP de peso molecular 40,000 [2%],  $\beta$ -Mercaptoethanol, y H<sub>2</sub>O estéril tratada con DEPC, y se continuó con los pasos establecidos en el protocolo. Cabe recalcar que el área y el material de trabajo para realizar la extracción se mantuvieron libres de RNasas mediante aplicación de una solución de RNASE AWAY (Molecular BioProducts).

### **Tratamiento con DNAsa**

Para eliminar el residuo de ADN genómico que pueden haber durante la extracción de ARN, se trató las muestras con el kit RQ1 RNase-Free DNase (Cat. # M6101 Promega), y con el protocolo de Tratamiento de la DNAsa establecido por el laboratorio de Biología Molecular del CIBE (APENDICE B). Se empleó fenol:cloroformo:IAA 25:24:1, y para el precipitado se usó NaAc [3M] Y EtOH frío [100%]. Para este proceso se mantuvo el mismo cuidado que con la extracción de ARN, el pellet se lo diluyó con agua DEPC. Para la cuantificación se usó el programa Take 3 Micro-Volume Plates en el equipo Synergy HT (Bio Tek).

#### **2.2.2 Síntesis de ADNc.**

Para realizar la síntesis de ADNc se usó el kit GoTaq 2-Step RT-qPCR System, (Promega Cat. # A6010), utilizándose 630 ng de ARN.

El protocolo del Kit establece lo siguiente:

Preparación del ARN y el Primer de la Transcripción reversa (Mix 1).- para ello se realiza un mix del ARN (hasta 5 µg por reacción) con Primers [Oligo (dT)] (un volumen de 1µl) y H<sub>2</sub>O si es necesario hasta

completar un volumen final de 10µl, luego se incuba por 5 minutos a 70° para la desnaturalización y luego pasa a hielo por 5 minutos.

La síntesis de ADNc con GoScript Reverse Transcriptase (Mix 2) se realizó mediante la preparación de un mix de los siguientes componentes con su volumen: Nuclease – Free Water (1.5µl), GoSript 5X reaction Buffer (5µl), MgCl<sub>2</sub> [25 mM] (2µl), PCR Nucleotide Mix [10 mM] (1µl), Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (0.5µl), GoScript Reverse Transcriptase (1µl), el volumen total es de 10µl.

Luego se combina las dos mezclas (Mix 1 y Mix 2) para completar un volumen final de 20 µl. Este paso se lo debe realizar sobre hielo y posteriormente se lo incuba a temperaturas descritas en la Tabla 2.5 (Para analizar el protocolo completo se puede visitar la página web de Promega [www.promega.es](http://www.promega.es) e introducir el nombre del kit).

**TABLA 2.5**  
**TEMPERATURAS PARA LA SÍNTESIS DE ADNc CON EL KIT**  
**GOTAQ 2-STEP RT-QPCR SYSTEM (PROMEGA)**

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Time</b>
Anillamiento	25°C	5 minutes
Extensión	42°C	1 hour
Inactivación	70°C	15 minutes
Enfriamiento	4°C	Hold

Una vez que se obtiene el ADNc se lo diluye 4 veces con agua autoclavada y se usa 2 µl para un volumen final de 10 µl en las reacciones de la PCR.

### **2.2.3 Identificación de genes expresados.**

Una librería sustractiva fue desarrollada en el CIBE (Santos et al. en preparación) en donde se identificaron genes que se sobre-expresan en 'Calcutta-4' cuando se inocula con *M. fijiensis*. En breve, se extrajo ARN de hojas de plantas de 'Calcutta-4' a los 6, 9 y 12 días después de inoculado con *M. fijiensis* y también de plantas de 'Calcutta-4' donde sólo se aplicó la solución pero sin *M. fijiensis*. ARN total se extrajo mediante el kit Spectrum™ Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich). A partir de 50 a 100 µg de ARN total, se purificó el ARNm mediante columna de Oligotex (Oligotex mRNA Mini kit, Qiagen). El ARNm aislado se utilizó en la generación de una librería sustractiva utilizando el PCR-Select™ cDNA Subtraction kit de



acuerdo al protocolo del fabricante (Clontech). EL ADNc de hojas inoculadas con *M. fijiensis* a los 6, 9 y 12 días después de inoculado fue usado como el “probador” mientras que el ADNc de hojas no inoculadas fueron usadas como “conductor”. Los ADNc sustraídos fueron clonados en el vector pGEM (pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega) y transformados en células competentes de *E. coli* (TOP10®, Invitrogen). Se aisló el plásmido de cada colonia de *E. coli* transformada y se secuenció en MacroGen (MacroGen Inc, Estados Unidos).

Del resultado de esta librería 19 genes fueron analizados para determinar su expresión.

Los genes que se usaron se describen en la Tabla 2.6 (código interno del laboratorio), y las secuencias de los *primers*, incluyendo el tamaño de los amplicones se indican en el Apéndice E.

**TABLA 2.6**  
**CÓDIGO DE GENES USADOS PARA DETERMINAR SU**  
**EXPRESIÓN**

Gen Code (BM - CIBE)	
ESO1 - B5	ESO2 - A10
ESO1 - B9	ESO2 - A11
ESO1 - C3	ESO2 - C8
ESO1 - C7	ESO2 - D3
ESO1 - C8	ESO2 - D6
ESO1 - C9	ESO2 - D11
ESO1 - C10	ESO2 - D12
ESO1 - G10	ESO2 - E7
ESO1 - E5	ESO2 - F8
	ESO2 - G4

Los genes provienen del resultado de la librería SSH que se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del CIBE – ESPOL.

### **Expresión de genes**

Se realizó una RT-PCR con los 19 genes posibles candidatos a resistencia usando las muestras de ADNc de los 6 dpi.

La expresión de genes se la determinó usando el valor de la intensidad de la banda utilizando el programa Quantity One (Biorad), incluyendo el gen *housekeeping* (Actina).

Cada valor del gen de interés se dividió con el valor del *housekeeping*, para así obtener un resultado estandarizado.

Una vez que los valores de todos los genes fueron estandarizados, se realizó los siguientes cálculos para estimar el nivel de expresión: la muestra de la variedad resistente inoculada con su control ('*Calcutta*' inoculado / '*Calcutta*' control); la muestra de la variedad resistente inoculada con la muestra de la variedad susceptible inoculada ('*Calcutta*' inoculado / '*Williams*' inoculado); la muestra de la variedad susceptible inoculada con su control ('*Williams*' inoculado / '*Williams*' control). El valor de cada relación es una estimación de la expresión que tiene cada gen en relación con los diferentes tratamientos. Valores mayores a 1 sugieren una sobre expresión.

Del resultado de estos cálculos se tomó cuatro genes que fueron los más significativos por la sobre-expresión de la variedad resistente inoculada con *M. fijiensis* para luego realizar la PCR semi-cuantitativa.

Para analizar la expresión de estos cuatro genes se tomó la intensidad de la banda en la fase exponencial, incluyendo el gen *housekeeping* Factor de elongación 1 (EF1), Estos cálculos se lo realizaron en todos los puntos de tiempo de las muestras recolectadas.

### PCR Semi-cuantitativo.

Para realizar la mezcla de PCR se usó el protocolo descrito en la Tabla 2.7

**TABLA 2.7**

#### **PROTOCOLO DE LA PCR PARA ESTABLECER EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES**

<b>Componente</b>	<b>Volumen (µl)</b>	<b>Concentración final</b>
Green GoTaq (Promega)	5	1X
Primer Forward <sup>a</sup>	0.25	250nM
Primer Reverse <sup>a</sup>	0.25	250nM
ADNc	2	-
H <sub>2</sub> O	2.5	-
Volumen final	10	-

El programa que se usó para las PCR fueron los siguientes: 95°C por 2 min, 34 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 45 s, y 72°C por 5 min. <sup>a</sup> Las secuencias de los primers se los puede apreciar en el apéndice e, en los genes evaluados para esta técnica.

Todos los primers probados se basaron en este protocolo, a excepción del gen *Housekeeping* EF1 debido a que la temperatura de anillamiento es de 62°C.

Para determinar la PCR semicuantitativa se establecieron cuatro ciclos, en estos se determinó la fase exponencial de cada muestra

de ADNc, es decir la fase anterior a la lineal y la plateau. Los ciclos que se establecieron fueron 25, 28, 31, 34.

Una vez que se realizó la PCR, los amplicones se detectaron mediante gel de agarosa al 2% en electroforesis (Biorad) con un tiempo de 30 min a 100 V y se lo reveló usando el equipo GelDoc XR+ (Biorad) usando el software Quantity One. Este programa nos permite determinar la intensidad de las bandas, y así poder estimar la expresión génica, mediante la estandarización del gen de interés con el *housekeeping* gen.

#### **2.2.4 Análisis bioinformático de secuencias.**

Las secuencias obtenidas de la librería sustractiva desarrollada con anterioridad por el laboratorio de Biología Molecular del CIBE, fueron procesadas para remover las secuencias del vector de clonación y de los adaptadores mediante el programa CLC Genomics Workbench 5.5.1, obteniendo las secuencias del gen.

El análisis bioinformático de los genes de banano se lo realizó realizando Blastn y Blastx en distintas bases de datos de web, tales como Banana genome, NCBI, TAIR, UNIPROT (APENDICE F).

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Interacción planta – patógeno.

#### **Evaluación de síntomas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet**

La evaluación se la realizó durante siete semanas seguidas en dos ensayos diferentes con las variedades de 'Calcutta-4' (Resistente), 'Tuu Gia' (Resistente) y la variedad 'Williams' (Susceptible) (APENDICE C) para lo cual se determinó el Área Bajo la Curva (ABC) para medir la acumulación de la enfermedad conforme avanza el tiempo, El análisis del ABC se lo determinó en las hojas # 2 y 3. La prueba de Shapiro Wilk indicó que existe normalidad en los datos analizados de forma independiente en las variedades (Tabla 3.1).

TABLA 3.1

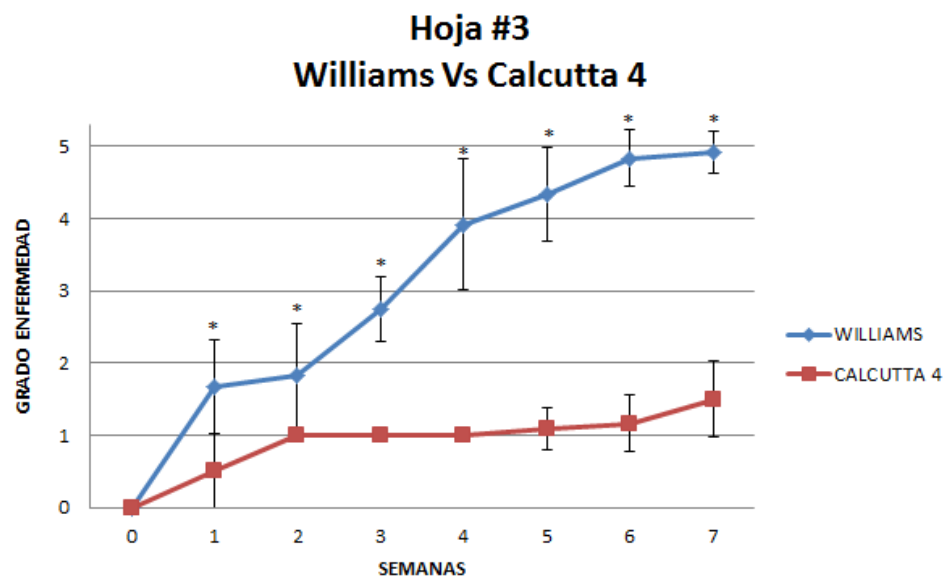
**ÁREA BAJO LA CURVA Y PRUEBA DE LA NORMALIDAD DE LAS  
DISTINTAS VARIEDADES EVALUADAS.**

Ensayo <i>Williams</i> - <i>Calcutta-4</i> - <i>M. fijiensis</i> <sup>a</sup>				
Variedad	# Hoja <sup>c</sup>	ABC	D.E	p(Unilateral D) <sup>d</sup>
<i>Williams</i>	2	20.58	3.5	0.4277
<i>Williams</i>	3	21.79	3.31	0.6277
<i>Calcutta-4</i>	2	7.58	2.22	0.1582
<i>Calcutta-4</i>	3	6.5	0.98	0.06
Ensayo <i>Williams</i> - <i>Tuu Gia</i> - <i>M. fijiensis</i> <sup>b</sup>				
<i>Williams</i>	2	12.08	1.93	0.446
<i>Williams</i>	3	13.58	0.8	0.3727
<i>Tuu Gia</i>	2	4.83	0.82	0.0863
<i>Tuu Gia</i>	3	6.83	2.71	0.6996

Área bajo la curva (ABC) de los ensayos evaluados bajo condiciones de invernadero. Los ensayos se los realizaron en diferentes tiempos.<sup>a</sup> En este ensayo se usaron 12 réplicas biológicas por variedad. <sup>b</sup> En este ensayo se usaron 6 réplicas biológicas por variedad. <sup>c</sup> Número de hoja de la planta. <sup>d</sup> Valor p de la prueba de la normalidad de la prueba de Shapiro wilk con un nivel de significancia del 95%.

Se realizó una comparación entre ambas hojas al igual que entre variedades de los síntomas evaluados en el avance de la enfermedad, el cual de acuerdo al ensayo realizado mostró lo siguiente:

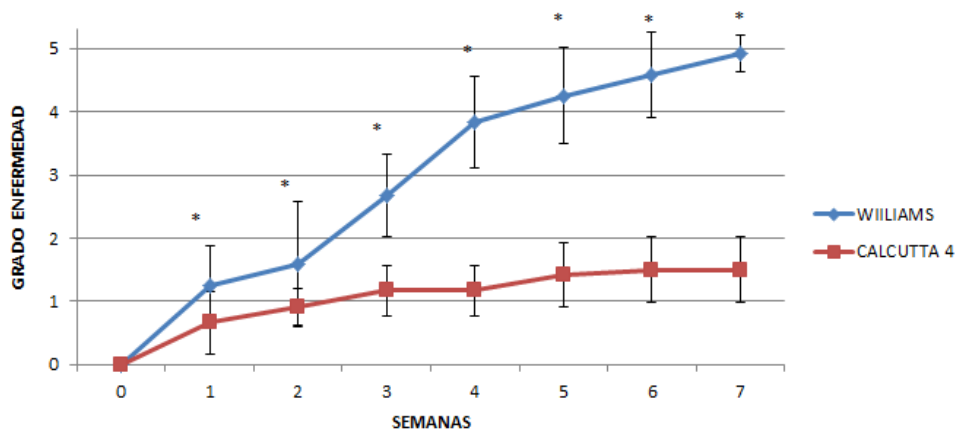
En el ensayo 'Williams' - 'Calcutta-4' - *M. fijiensis* existe diferencia significativas a partir de la primera semana de evaluación en las hojas 2 y 3 comparadas entre variedades (susceptible vs resistente) (FIGURA 3.1 y 3.2) y que no existe diferencia entre las hojas 2 y 3 de las misma variedad (FIGURA 3.3 y 3.4).



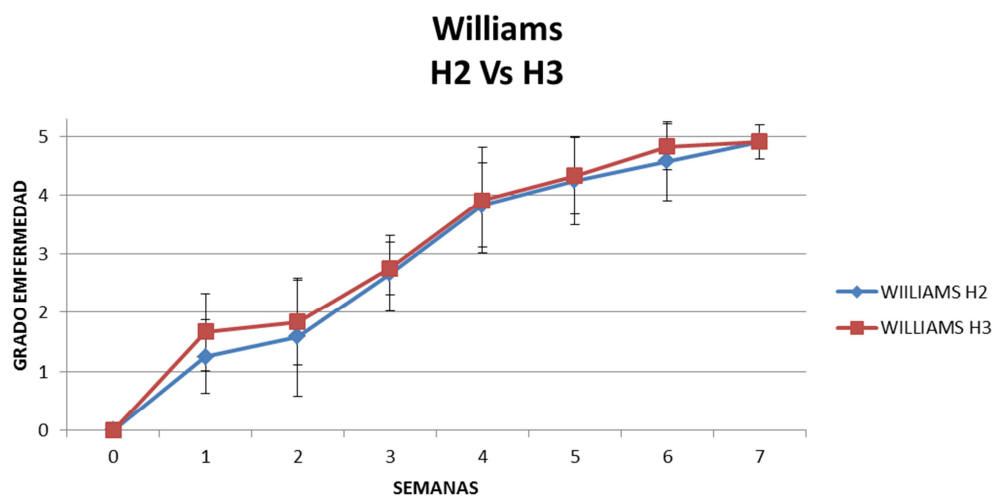
**FIGURA 3.1 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LAS VARIETADES 'WILLIAMS' VS 'CALCUTTA-4' EN LA HOJA # 3.** Cada punto evaluado cuenta con un n=12, los \* indican que existe diferencias significativas en la semana con un nivel de significancia del 95%. La desviación estándar de cada variedad se indica en el punto de la semana evaluada.



### Hoja #2 Williams Vs Calcutta 4

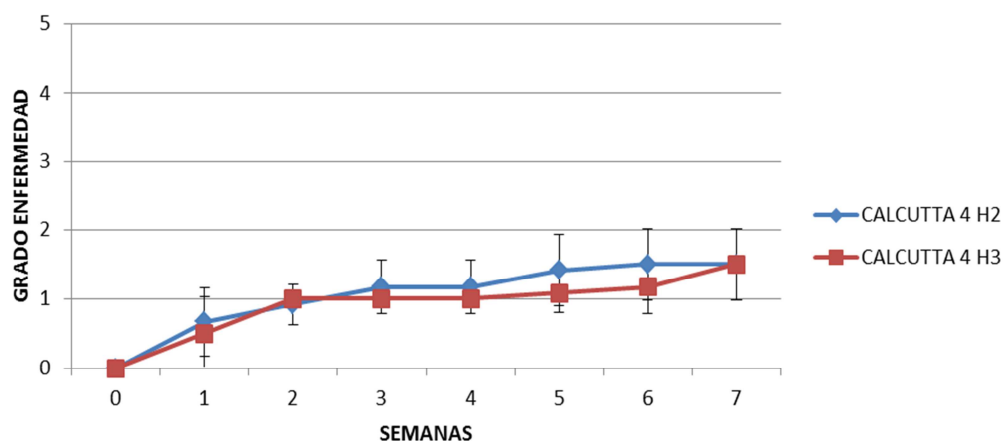


**FIGURA 3.2 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LAS VARIEDADES 'WILLIAMS' VS 'CALCUTTA-4' EN LA HOJA # 2.** Cada punto evaluado cuenta con un n=12, los \* indican que existe diferencias significativas en la semana con un nivel de significancia del 95%. La desviación estándar de cada variedad se indica en el punto de la semana evaluada.



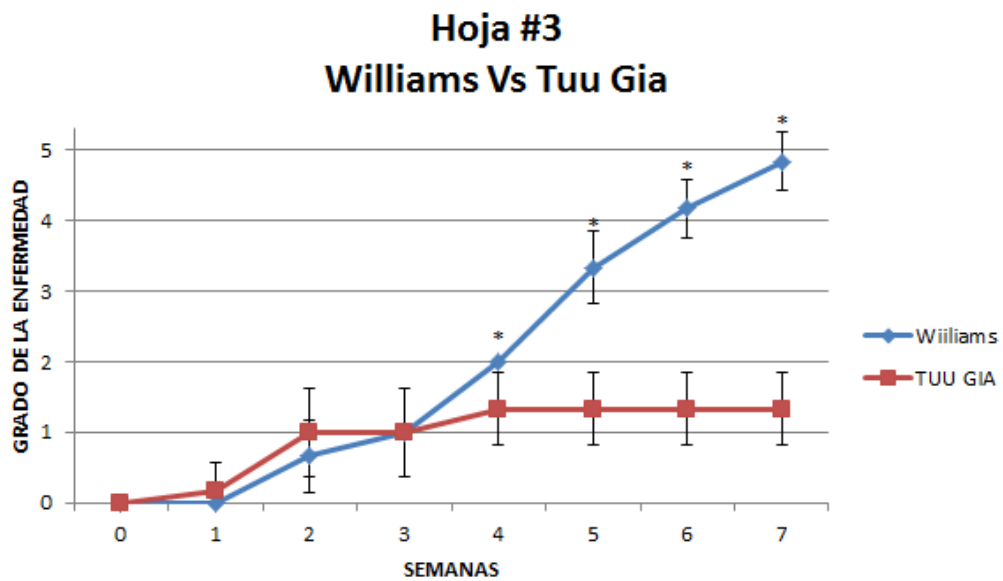
**FIGURA 3.3 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LA VARIEDAD 'WILLIAMS' COMPARADA ENTRE LAS HOJA # 2 VS HOJA # 3 DEL ENSAYO 'WILLIAMS' – 'CALCUTTA-4'.** Cada punto evaluado cuenta con un n=12, los \* indican que existe diferencias significativas en la semana con un nivel de significancia del 95%. La desviación estándar de cada variedad se indica en el punto de la semana evaluada.

### Calcutta 4 H2 Vs H3



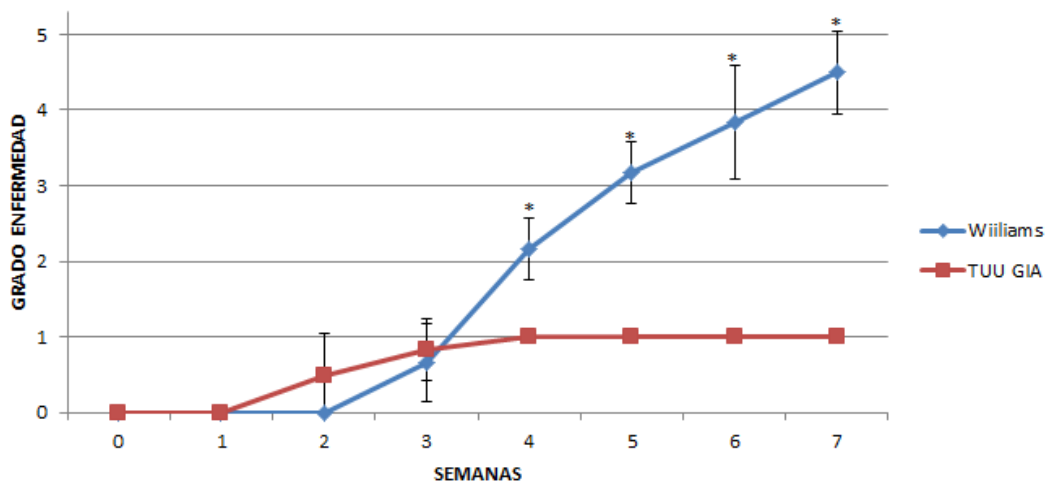
**FIGURA 3.4 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LA VARIEDAD 'CALCUTTA-4' COMPARADA ENTRE LAS HOJA # 2 VS HOJA # 3.** Cada punto evaluado cuenta con un n=12, los \* indican que existe diferencias significativas en la semana con un nivel de significancia del 95%. La desviación estándar de cada variedad se indica en el punto de la semana evaluada.

En el ensayo '*Williams*' – '*Tuu Gia*' - *M. fijiensis* se demostró que existen diferencias significativas a partir de la cuarta semana evaluada en las hojas 2 y 3 comparadas entre variedades (FIGURA 3.5 y 3.6), y que no existe diferencia significativas al ser comparada entre hojas de la misma variedad (FIGURA 3.7 y 3.8).

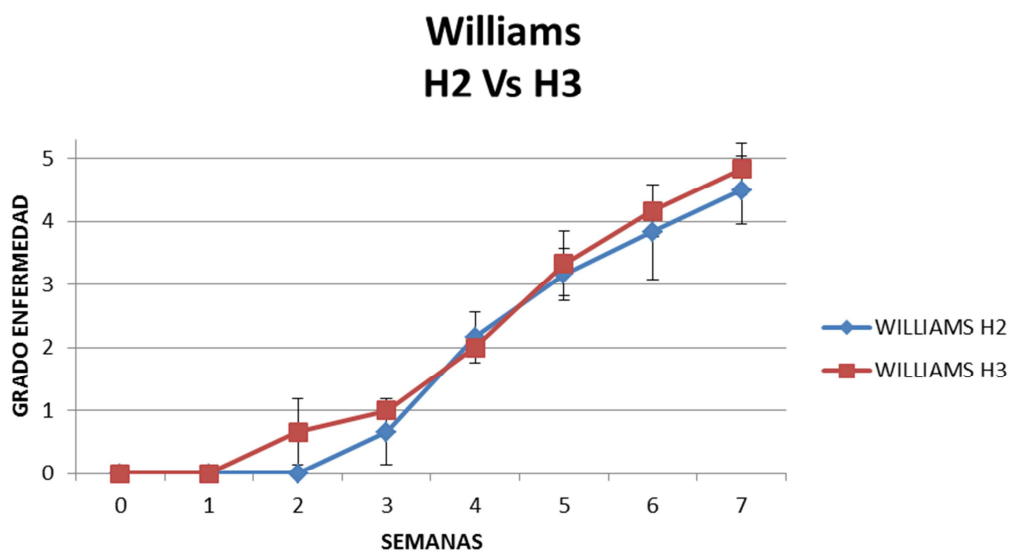


**FIGURA 3.5 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LAS VARIETADES 'WILLIAMS' VS 'TUU GIA' EN LA HOJA # 3.** Cada punto evaluado cuenta con un n=6, los \* indican que existe diferencias significativas en la semana con un nivel de significancia del 95%. La desviación estándar de cada variedad se indica en el punto de la semana evaluada.

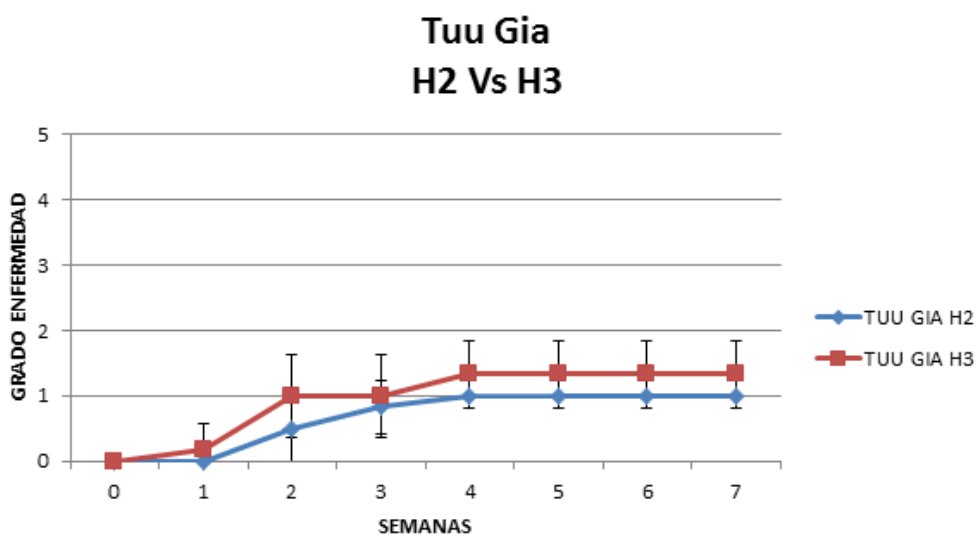
### Hoja #2 Williams Vs Tuu Gia



**FIGURA 3.6 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LAS VARIEDADES 'WILLIAMS' VS 'TUU GIA' EN LA HOJA # 2.** Cada punto evaluado cuenta con un  $n=6$ , los \* indican que existe diferencias significativas en la semana con un nivel de significancia del 95%. La desviación estándar de cada variedad se indica en el punto de la semana evaluada.



**FIGURA 3.7 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LA VARIEDAD ‘WILLIAMS’ COMPARADA ENTRE LAS HOJA # 2 VS HOJA # 3 DEL ENSAYO ‘WILLIAMS’ – ‘TUU GIA’.** Cada punto evaluado cuenta con un n=6, los \* indican que existe diferencias significativas en la semana con un nivel de significancia del 95%. La desviación estándar de cada variedad se indica en el punto de la semana evaluada.



**FIGURA 3.8 AVANCE DE SÍNTOMAS DE SIGATOKA NEGRA EN LA VARIEDAD 'TUU GIA' COMPARADA ENTRE LAS HOJA # 2 VS HOJA # 3.** Cada punto evaluado cuenta con un  $n=6$ , los \* indican que existe diferencias significativas en la semana con un nivel de significancia del 95%. La desviación estándar de cada variedad se indica en el punto de la semana evaluada.

### Conteo de estomas penetrados

El conteo de estomas penetrados se lo realizó en cortes de 1 cm<sup>2</sup> a los 26 dpi en la hoja número 3 por ser la más representativa. Para el conteo se escogieron 3 plantas de cada variedad (Tabla 3.2)

**TABLA 3.2**

**NÚMERO DE ESTOMAS PENETRADOS POR *M. fijiensis* EN  
VARIEDAD RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE DE BANANO.**

<b>CONTEO DE LOS CONIDIOS PENETRADOS</b>		
<b>'WILLIAMS'</b>		
<b>Código <sup>a</sup></b>	<b># Hoja</b>	<b>#CONIDIOS PENETRADOS</b>
WP1MF	3	6
WP2MF	3	9
WP3MF	3	4
<b>'CALCUTTA-4'</b>		
CTAP1MF	3	1
CTAP2MF	3	1
CTAP3MF	3	0

Las muestras fueron recogidas a los 26 dpi. <sup>a</sup> código de la planta, el cual indica la variedad, número de réplica biológica y tratamiento con *M.fijiensis*.

Mediante la prueba de Tuckey se realizó una comparación para demostrar diferencias significativas entre las distintas variedades en la hoja 3, el mismo que nos indicó que si existen diferencias significativas (Tabla 3.3).



**TABLA 3.3****PRUEBA DE TUCKEY DE ESTOMAS PENETRADOS.**

Medias con una letra común no son significativamente diferentes

Tuckey ( $p > 0.05$ ).

---

**Williams vs Calcutta 4 (H3)**

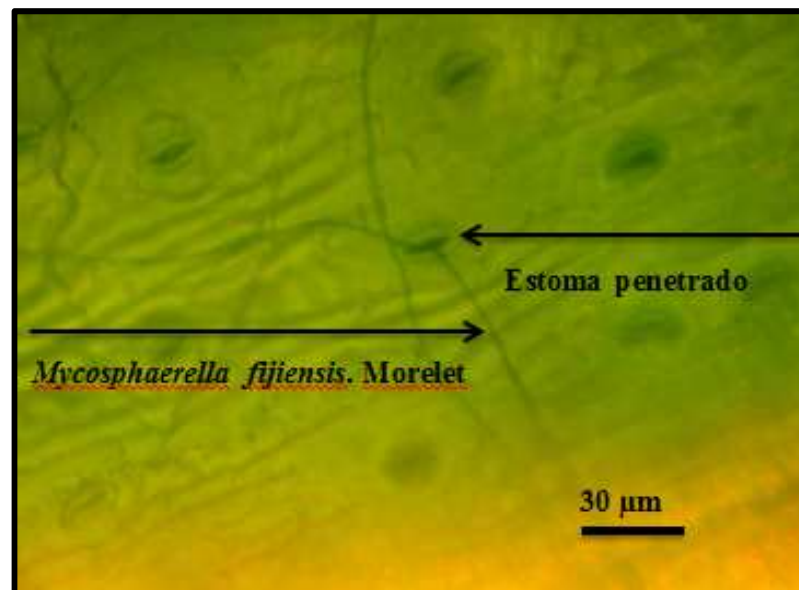
Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.13890

Error: 3.3333 gl: 4

Variedad	Medias	n	E.E.	
Calcuta H3	0.67	3	1.05	A
Williams H3	6.33	3	1.05	B

---

En el momento de realizar el conteo de los estomas se pudo observar estructuras del hongo que penetraban los estomas abiertos del tejido vegetal y otros que se encontraba a un lado del estoma (FIGURA 3.9).



**FIGURA 3.9 ESTOMAS PENETRADOS POR *M. fijiensis* EN TEJIDO DE BANANO.** Penetración de hifas de *M. fijiensis* en los estomas de banano de la variedad 'Williams', susceptible a la sigatoka negra.

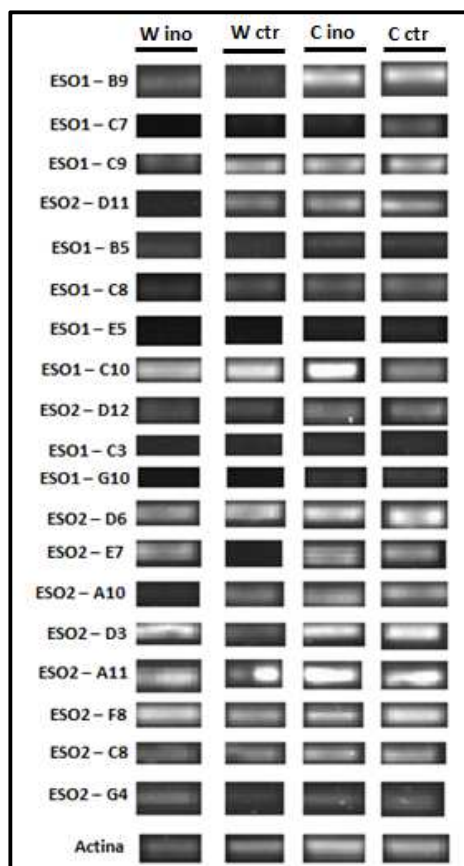
FUENTE: Foto tomada por Ricardo Pacheco en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador – ESPOL, Laboratorio de Fitopatología.

A medida que avanzaba los días se pudo notar que la gravedad de los síntomas en la variedad susceptible iba aumentando a diferencia de la variedad resistente (APENDICE D).

## 3.2 Identificación de genes.

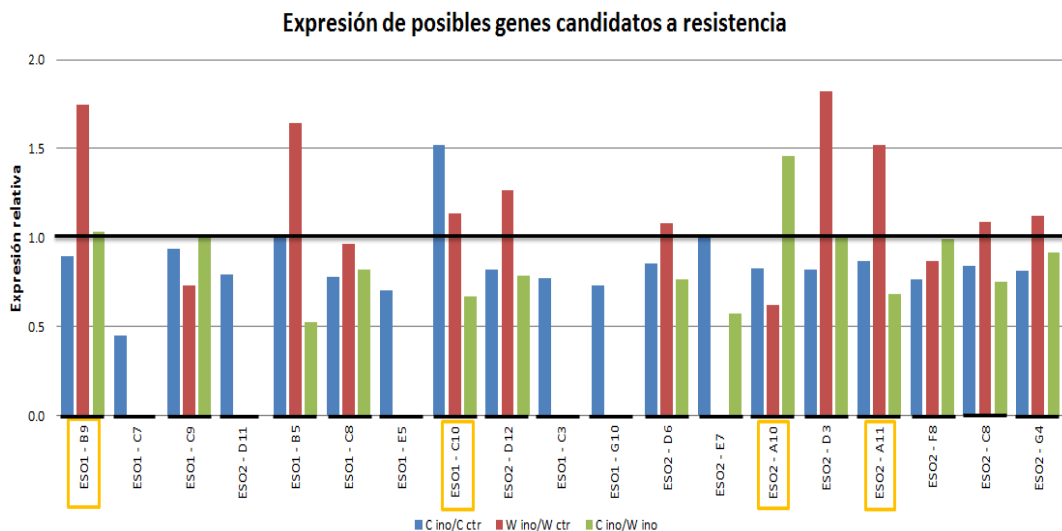
### Expresión de genes

Se efectuó el análisis de expresión de los posibles genes candidatos a resistencia a *M. fijiensis* realizando una RT-PCR a los 6 dpi, de los cuales se determinó cuatros genes que fueron los más significativos debido a la sobre expresión que se observó en la variedad resistente (*Calcutta-4*) inoculado con el hongo patógeno, para luego para realizar la técnica de PCR semi-cuantitativo en todos los puntos de tiempo. (FIGURA 3.10 y 3.11).



**FIGURA 3.10 EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS A RESISTENCIA**

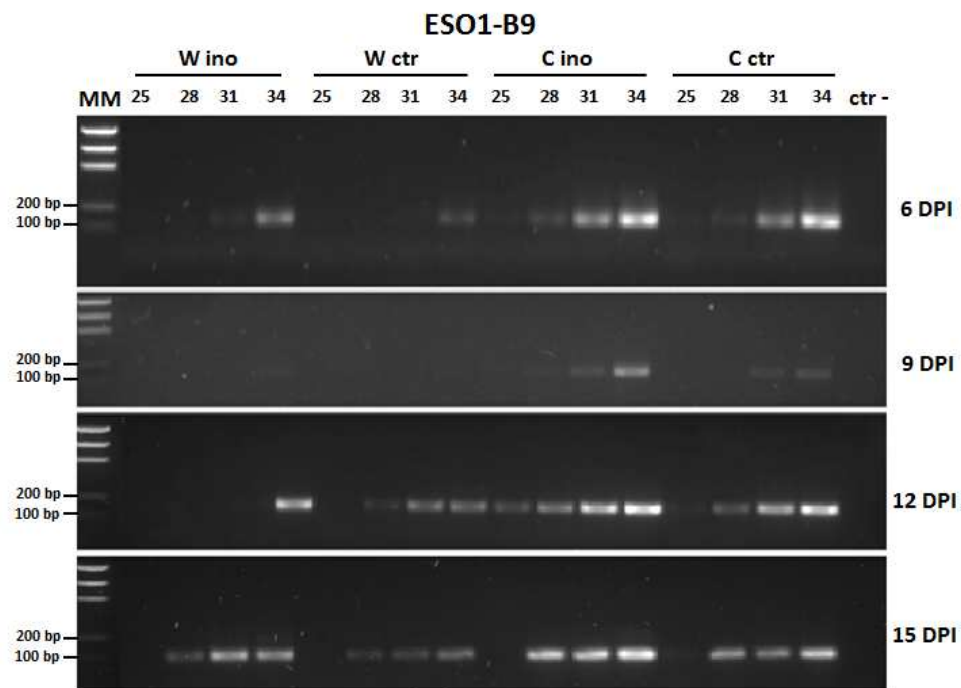
**A *M. fijiensis*.** La figura indica la intensidad de las bandas en cada gen. El tamaño de las bandas se lo puede apreciar en el apéndice E. Las fotos fueron tomadas en un gel de agarosa al 2% y a condiciones de electroforesis de 100 V por 30 min. C: '*Calcutta-4*', W: '*Williams*', ino: inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control. Las condiciones que se usó para hacer la PCR fueron 95°C por 2 min, 35 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 72°C por 45 s, y 72°C por 5 min.



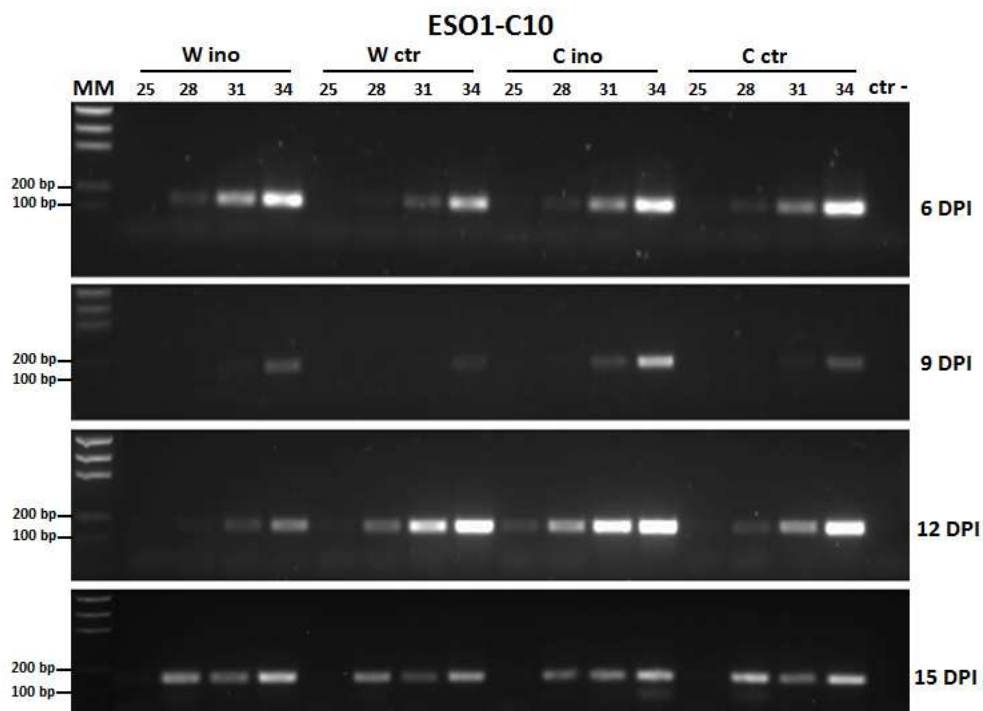
**FIGURA 3.11 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES CANDIDATOS A RESISTENCIA A *M. fijiensis*.** Las barras indican el nivel de expresión de cada gen en base a la relación a las variedades evaluadas durante la RT-PCR. Las barras ausentes indican que no hubo expresión del gen. La línea sobre puesta indica que los valores mayores a uno existe una sobre expresión y valores menores a uno una represión comparando el numerador con el denominador (ver descripción de los colores de barras). C: 'Calcutta-4', W: 'Williams', ino: inoculación con *M. fijiensis*, ctr Muestra control. Los cuatros genes marcados con un rectángulo se les realizó la técnica de PCR semi-cuantitativo.

### **PCR semi-cuantitativo**

La PCR semi-cuantitativo se la aplicó en cuatro genes, que fueron los más significativos por la sobre-expresión de la variedad resistente inoculada con *M. fijiensis* en el resultado de la RT-PCR. Se tomó todos los puntos de recolección (6, 9, 12, 15 dpi) para realizar esta técnica y se tomó para los análisis el amplicón en la fase exponencial (estimado al analizar la intensidad progresiva en ciclos sucesivos) para el análisis del resultado (FIGURA 3.12 – 3.15).

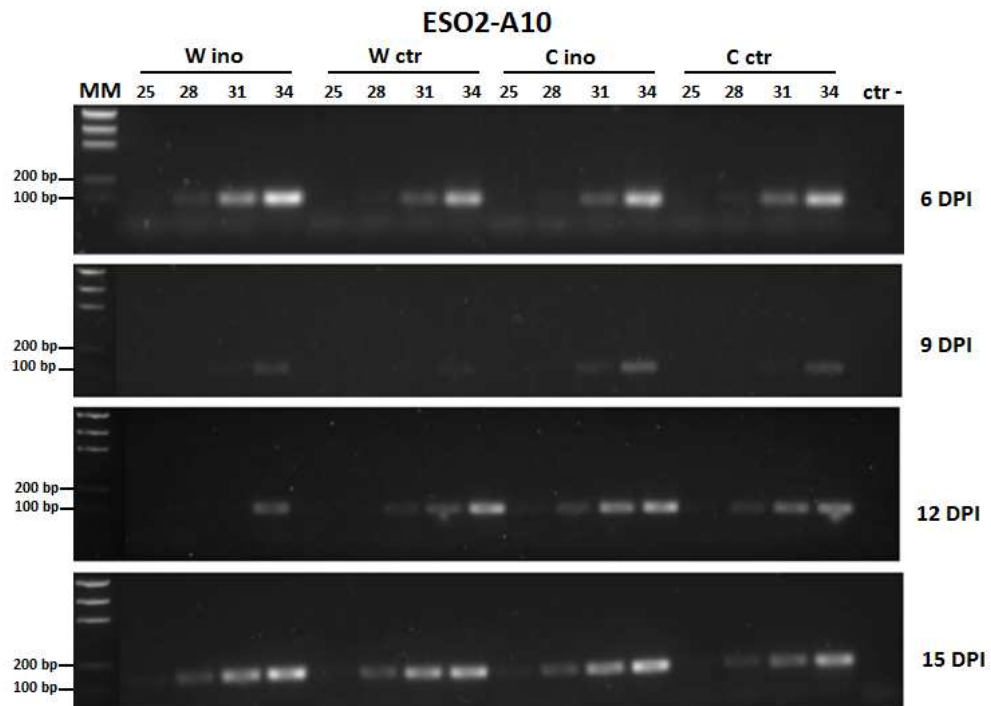


**FIGURA 3.12 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN ESO1-B9 CON MUESTRAS DE ADNC DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A *M. fijiensis*.** Los números 25, 28, 31, 34 son los ciclos de amplificación de la PCR. MM: marcador molecular de 100 bp de marca Lonza (catálogo # 50334). DPI días post inoculación. C: 'Calcutta-4', W: 'Williams', ino inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control. ctr -: Control negativo.

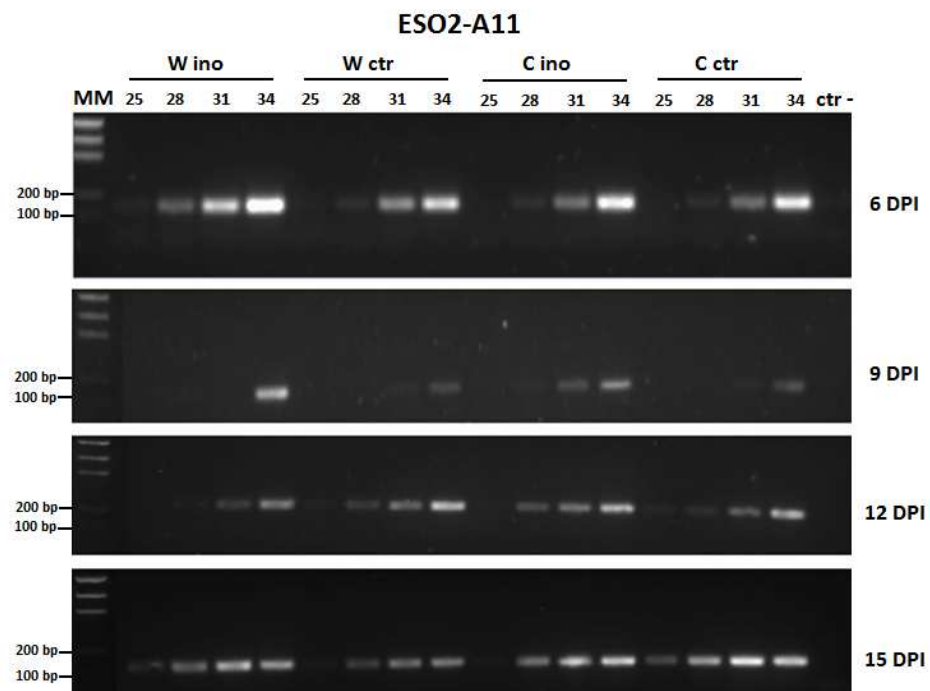


**FIGURA 3.13 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN ESO1-C10 CON MUESTRAS DE ADNC DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A *M. fijiensis*.** Los números 25, 28, 31, 34 son los ciclos de amplificación de la PCR. MM: marcador molecular de 100 bp de marca Lonza (catálogo # 50334). DPI días post inoculación. C: ‘*Calcutta-4*’, W: ‘*Williams*’, ino inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control. ctr -: Control negativo.

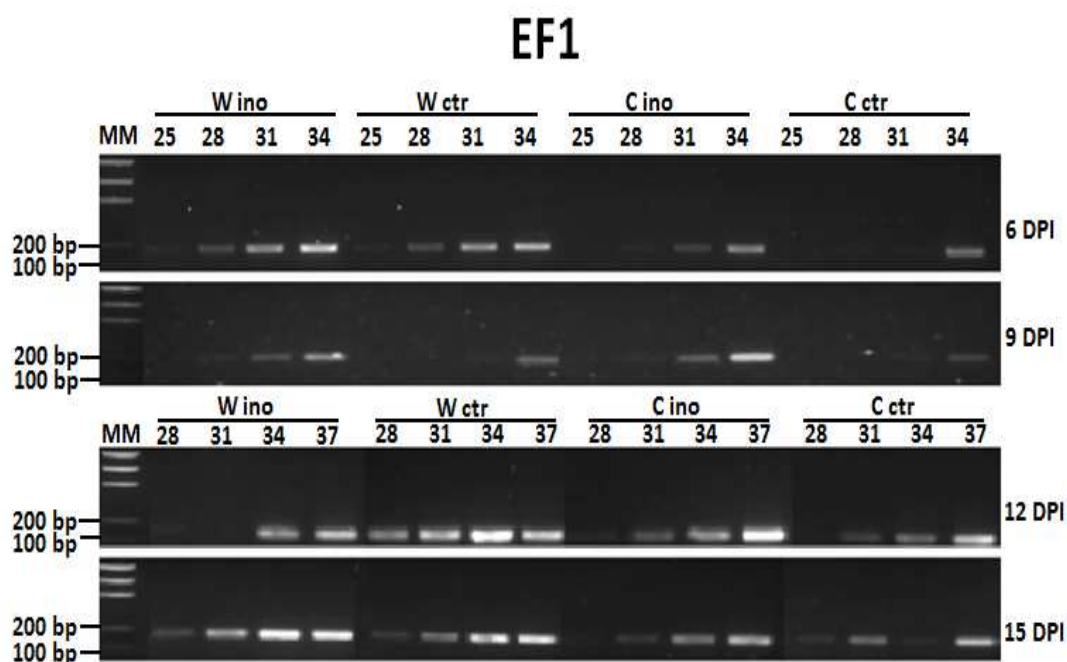




**FIGURA 3.14 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN ESO2-A10 CON MUESTRAS DE ADNC DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A *M. fijiensis*.** Los números 25, 28, 31, 34 son los ciclos de amplificación de la PCR. MM: marcador molecular de 100 bp de marca Lonza (catálogo # 50334). DPI días post inoculación. C: '*Calcutta-4*', W: '*Williams*', ino inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control. ctr -: Control negativo.

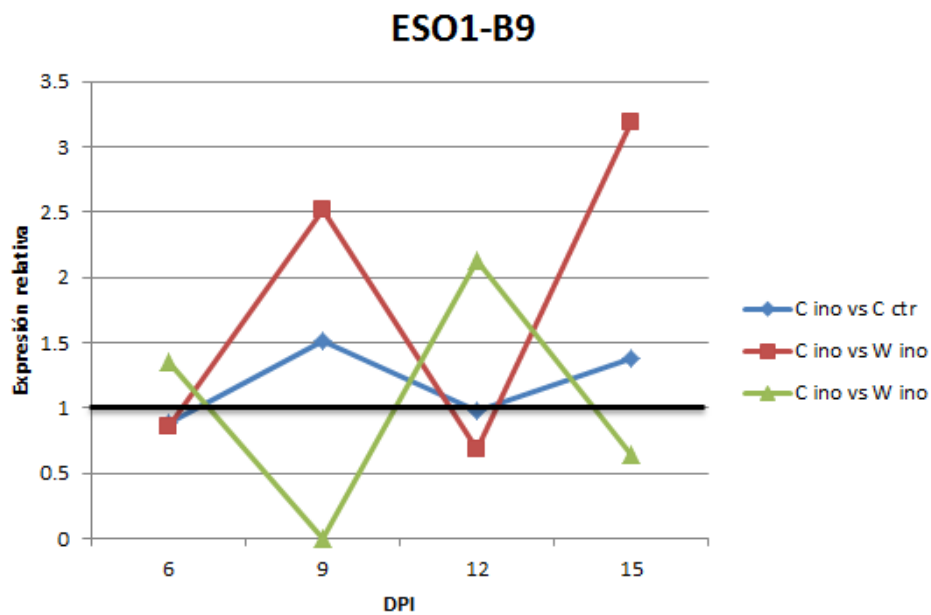


**FIGURA 3.15 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN ESO2-A11 CON MUESTRAS DE ADNC DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A *M. fijiensis*.** Los números 25, 28, 31, 34 son los ciclos de amplificación de la PCR. MM: marcador molecular de 100 bp de marca Lonza (catálogo # 50334). DPI días post inoculación. C: '*Calcutta-4*', W: '*Williams*', ino inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control. ctr -: Control negativo.



**FIGURA 3.16 PCR SEMI-CUANTITATIVO DEL GEN EF1 (ELONGATION FACTOR ONE) CON MUESTRAS DE ADNC DE LAS VARIEDADES SUSCEPTIBLE Y RESISTENTE A *M. fijiensis*.** El EF1 se lo usó como housekeeping. Los números 25, 28, 31, 34, 37 son los ciclos de amplificación de la PCR. MM: marcador molecular de 100 bp de marca Lonza (catálogo # 50334). DPI días post inoculación. C: ‘*Calcutta-4*’, W: ‘*Williams*’, ino inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control.

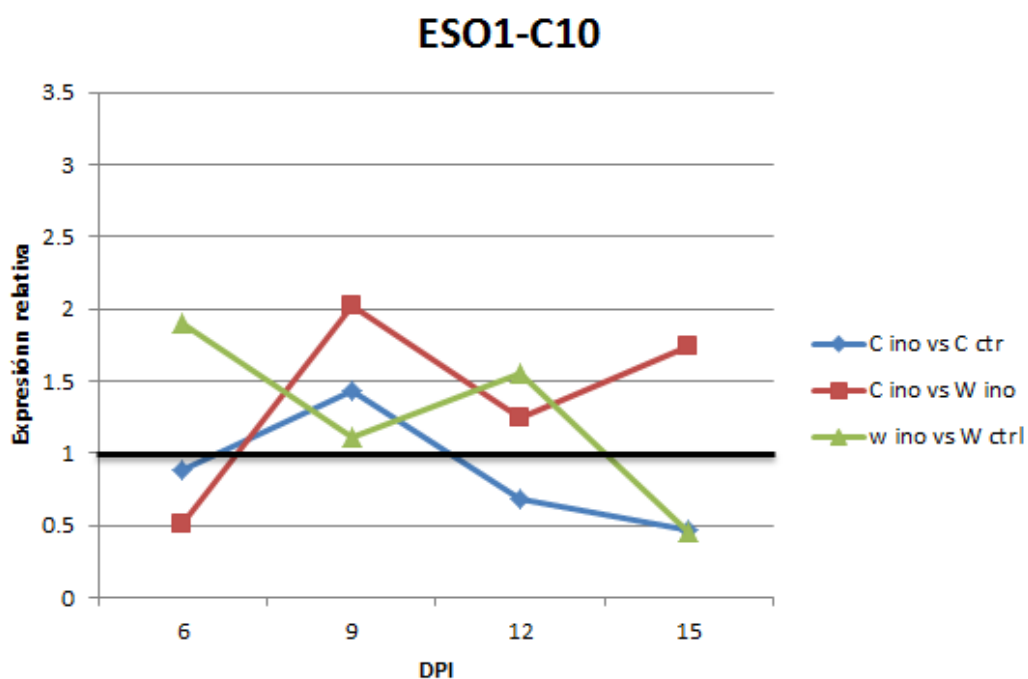
Luego de realizarse la PCR semi-cuantitativa se tomó la banda en la fase exponencial de cada muestra para realizar el análisis y comparación entre dpi de cada gen (Figura 3.17 – 3.20)



**FIGURA 3.17 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN ESO1-B9 A LOS 6 DPI, 9 DPI, 12 DPI Y 15 DPI.** En el eje Y se muestra la expresión relativa y en el eje X los Días Post inoculación. La línea sobre puesta indica que los valores mayores a uno existe una sobre expresión y valores menores a uno una represión. C: '*Calcutta-4*', W: '*Williams*', ino: inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control.

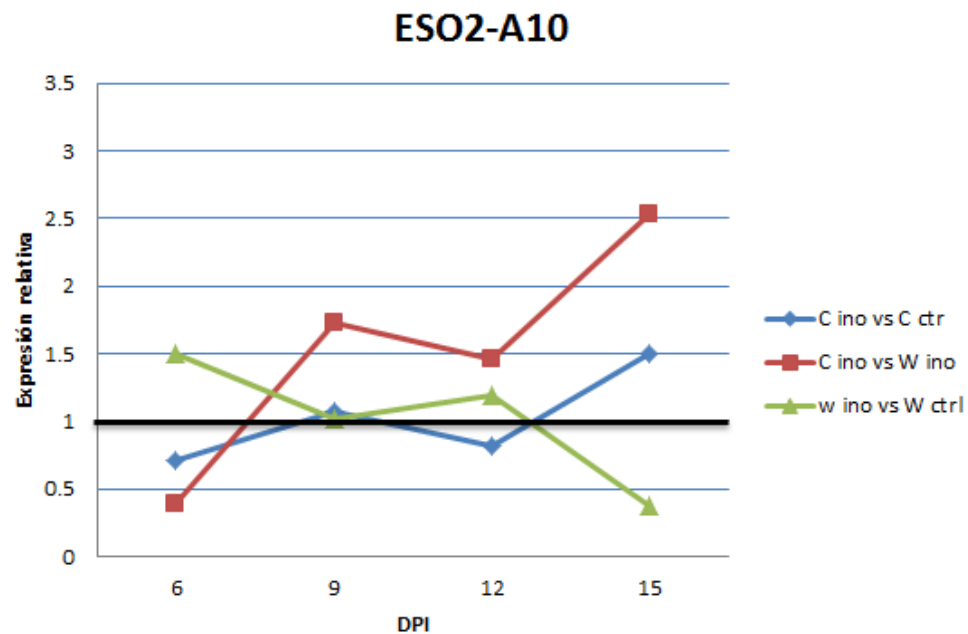
En la relación entre '*Calcutta-4*' inoculado y '*Williams*' inoculado se puede observar que existe una sobre expresión del gen ESO1-B9 a los 9 y 15 dpi, la cual es la más representativa comparada con las demás relaciones en el cual a pesar de que también hay sobre expresión esta decae al llegar a los 15 dpi, quiere decir que el gen en la variedad '*Calcutta-4*' cuando esta con la infección se está expresando más que en la variedad '*Williams*' también infectado con el patógeno.

Se puede notar que el nivel de expresión en Cino/Wino (línea roja) vs Wino/Wctr (línea verde) es inversamente proporcional en los días 9, 12 y 15 dpi, favoreciendo con una sobre expresión en Cino/Wino, esto sugiere que en la variedad 'Calcutta-4' hay una mayor expresión de este gen comparado con la variedad 'Williams'.



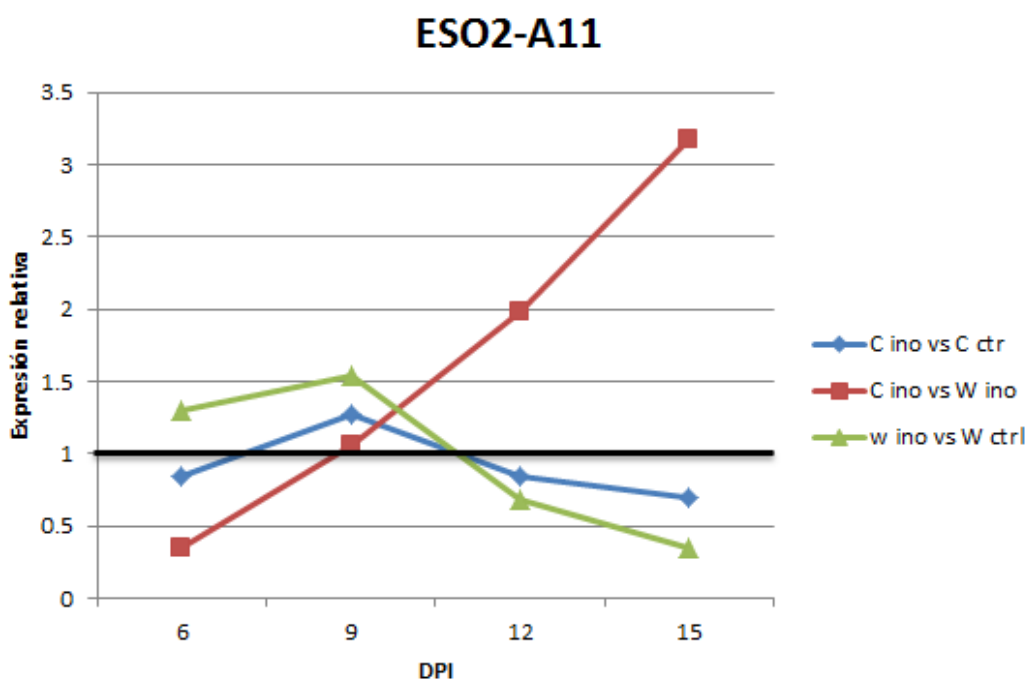
**FIGURA 3.18 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN ESO1-C10 A LOS 6 DPI, 9 DPI, 12 DPI Y 15 DPI.** En el eje Y se muestra la expresión relativa y en el eje X los Días Post inoculación. La línea sobre puesta indica que los valores mayores a uno existe una sobre expresión y valores menores a uno una represión. C: 'Calcutta-4', W: 'Williams', ino: inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control.

La sobre expresión del gen ESO1-C10 se la puede observar a los 9 dpi en todas la relaciones, pero al llegar a los 15 dpi 'Calcutta-4' inoculado sobre 'Williams' inoculado es la única que se mantiene, las demás decaen a una represión.



**FIGURA 3.19 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN ESO2-A10 A LOS 6 DPI, 9 DPI, 12 DPI Y 15 DPI.** En el eje Y se muestra la expresión relativa y en el eje X los Días Post inoculación. La línea sobre puesta indica que los valores mayores a uno existe una sobre expresión y valores menores a uno una represión. C: 'Calcutta-4', W: 'Williams', ino: inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control.

A partir de los 9 dpi existe una sobre expresión del gen ESO2-A10 sólo en la relación entre 'Calcutta-4' inoculado sobre 'Williams' inoculado la cual decae levemente al llegar a los 12 dpi pero se mantiene sobre expresado y luego sube los 15 dpi, esto quiere decir que el gen en la variedad 'Calcutta-4' se está expresando más que en la variedad 'Williams'.



**FIGURA 3.20 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN ESO2-A11 A LOS 6 DPI, 9 DPI, 12 DPI Y 15 DPI.** En el eje Y se muestra la expresión relativa y en el eje X los Días Post inoculación. La línea sobre puesta indica que los valores mayores a uno existe una sobre expresión y valores menores a uno una represión. C: 'Calcutta-4', W: 'Williams', ino: inoculación con *M. fijiensis*, ctr: Muestra control.

En la relación entre '*Calcutta-4*' inoculado y '*Williams*' inoculado se observa un crecimiento en la expresión del gen ESO2-A11 a medida que avanzan los dpi, a diferencia de las demás relaciones en la cual existe un decaimiento al llegar a los 9 dpi, esto nos indica que en la variedad '*Calcutta-4*' existe una sobre expresión de este gen cuando está infectado con el hongo de la sigatoka negra en relación con la variedad '*Williams*' estando infectado.

### **Análisis bioinformático**

Se realizó el análisis bioinformático mediante un BLAST en distintas bases de datos (APENDICE F) con las secuencias de disponibles de los genes probados en este estudio, en el cual se identificó el E – value, el organismo del cual posee mayor semejanza incluyendo la proteína a cual codifica (Tabla 3.4) (APENDICE G Tabla completa).

Mediante el análisis bioinformático se pudo observar la ubicación de los genes en los once cromosomas del banano, así mismo se pudo estimar la cantidad de genes encontrados en un mismo cromosoma (FIGURA 3.21 Y 3.22)



Existieron genes en los cuales en algunas bases de datos usadas para realizar BLAST no se encontró información. Por otro lado el resultado de este análisis expuso que el gen ESO1-C3 no está caracterizado en ninguno de los cromosomas del banano según la base de datos de Banana Genome.

TABLA 3.4

## ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO EN BLAST DE DIFERENTES BASES DE DATOS.

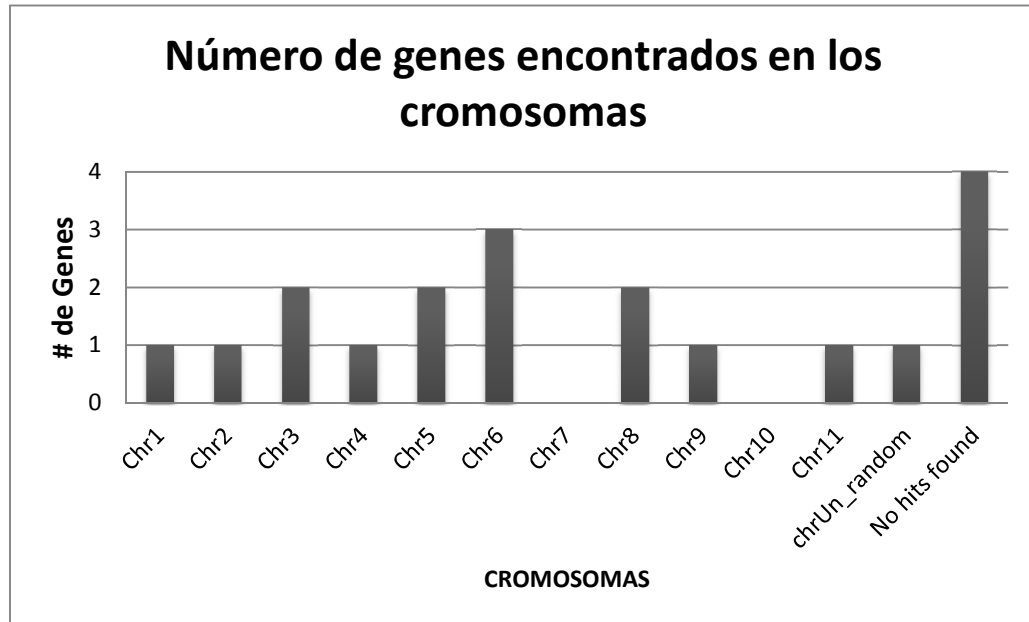
Gen Code (BM - CIBE)	Blast X Banana Genoma		Blastn NCBI (EST)		Blast Uniprot	
	E VALUE	DESCRIPTION	E VALUE	DESCRIPTION	E VALUE	DESCRIPTION
ESO1 - B5	No hits found		No hits found		6.1×10 <sup>-2</sup>	S3JWD7_KLEPN [PTS system cellobiose-specific transporter subunit IIA] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae B5055]
ESO1 - B9	3.E-43	GSMUA_Achr11T01090_001~ Serine carboxypeptidase-like 18~ SCPL18~ complete	No hits found		6.0×10 <sup>-45</sup>	MORNEO_MUSAM [Uncharacterized protein] [Musa Acuminata ]
ESO1 - C3	1.E-73	GSMUA_AchrUn_randomT01190_001 ~ Ankyrin repeat domain-containing protein 2~ AKR2~ complete	1.E-145	[ MACVLIMFLS005D_E03_b_019 MACVLIMFLS Musa acuminata cDNA clone MACVLIMFLS005D_E03_b_019 5', mRNA sequence] gb JK544075.1	9.0×10 <sup>-88</sup>	M0U5D1_MUSAM [Uncharacterized protein] [Musa Acuminata ]
ESO1 - C7	No hits found		6.E-84	[MUC4LC1010_D08_b_062. Musa acuminata leaves COLD stress Musa acuminata subsp. burmannicoides cDNA 5', mRNA sequence] gb DN239809.1	8.5×10 <sup>-1</sup>	C3Z107_BRAFL [Putative uncharacterized protein ]

La tabla continúa

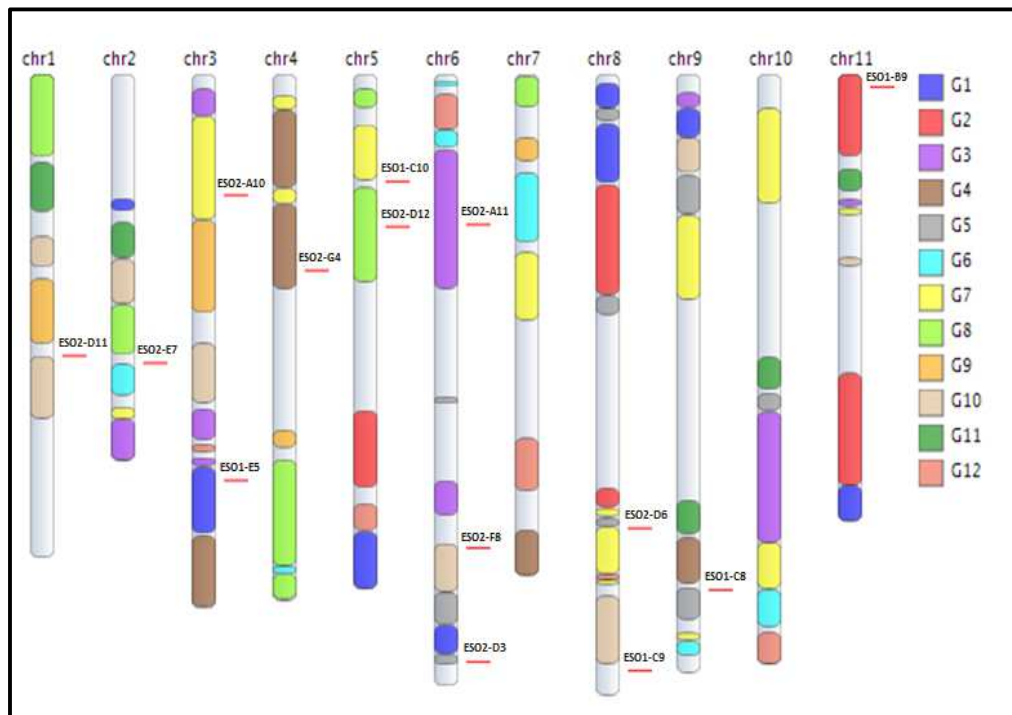
ESO1 - C8	2.E-44	GSMUA_Achr9T24740_001~ 22.3 kDa class VI heat shock protein~ HSP22.3~ modules	2.E-13	[Embrapa_Mbalbisiana_PKW_Leaf004_E10_b Embrapa_Musa balbisiana_PKW_Leaf Musa balbisiana cDNA, mRNA sequence.] gb FL646411.1	6.0×10-52	M0U381_MUSAM [ Uncharacterized protein Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) ]
ESO1 - C9	1.E-32	GSMUA_Achr8T32740_001~ V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit c1/c3/c5~ VHA-C1~ complete	0.E+00	MA4LIMFES006C_H04 MA4LIMFES Musa acuminata cDNA clone MA4LIMFES006C_H04 5', mRNA sequence. gb JK534160.1	3.0×10-37	I1J14_SOYBN [ Glycine max (Soybean) (Glycine hispida)] Uncharacterized protein
ESO1 - C10	1.E-100	GSMUA_Achr5T08410_001~ Putative Protein GPR107~ Gpr107~ fragment	3.E-121	[ZO_Ef0005H12.f ZO_Ef Zingiber officinale cDNA clone ZO_Ef0005H12 5', mRNA sequence.] gb DY372004.1	5.0×10-122	M0SWS0_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO1 - G10	No hits found		No hits found		No hits found	
ESO1 - E5	3.E-57	GSMUA_Achr3G22290_001~ Putative disease resistance RPP13-like protein 1~ RGA1~ missing_completeness	No hits found		3.0×10-67	A9Y8Q4_MUSAC Musa acuminata AAA Group (dessert banana) NBS-LRR class resistance protein
ESO2 - A10	2.E-26	GSMUA_Achr3T09560_001~ Putative Repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog~ MAF1~ fragment	9E-88	Embrapa_Musa_ABB_Stressed_Cachaco_D152 TFB Embrapa_Musa_Cachaco_ABB_Stressed Musa ABB Group cDNA, mRNA sequence. gb FL659918.1	3.0×10-29	M0SD73_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - A11	3.E-16	GSMUA_Achr6T12850_001~ Hypothetical protein~ Ndel1~ missing_functional_completeness	No hits found		4.0×10-63	M0T614_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - C8	No hits found		No hits found		No hits found	

La tabla continúa

ESO2 - D3	5.E-94	GSMUA_Achr6T35290_001~ expressed protein~ mx~ complete	0.E+00	Embrapa_Mbalbisiana_PKW_Root_009_h01- b Embrapa_Musa balbisiana_PKW_Root Musa balbisiana cDNA, mRNA sequence. gb FL649572.1	3.0×10 <sup>-116</sup>	M0TCX2_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis)
ESO2 - D6	5.E-54	GSMUA_Achr8T20830_001~ Heat shock cognate 70 kDa protein~ HSP70~ complete	0.E+00	EST1232150 ESTSYN-F Musa acuminata AAA Group cDNA clone pESTSYNF-5E19 5', mRNA sequence. gb ES431943.1	1.0×10 <sup>-63</sup>	K0A0D7_ELAGV Elaeis guineensis var. tenera (Oil palm) DnaK-type molecular chaperone hsp70 [Hsp70]
ESO2 - D11	5.E-92	GSMUA_Achr1T21370_001~ Transcription initiation factor IIB~ TFIIB~ complete	0.E+00	MACVLIMFLS026D_F11 MACVLIMFLS Musa acuminata cDNA clone MACVLIMFLS026D_F11 5', mRNA sequence. gb JK545824.1	1.0×10 <sup>-111</sup>	M0S1U5_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - D12	1.E-28	GSMUA_Achr5T12030_001~ Putative LanC-like protein 2~ Lancl2~ complete	5.E-178	MACVLIMFLS015A_H05 MACVLIMFLS Musa acuminata cDNA clone MACVLIMFLS015A_H05 5', mRNA sequence. gb JK545275.1	4.0×10 <sup>-30</sup>	M0SXT2_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - E7	1E-25	GSMUA_Achr2T14960_001~ Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic~ LHCA4~ complete	6E-126	MA4LIMFES006A_B10 MA4LIMFES Musa acuminata cDNA clone MA4LIMFES006A_B10 5', mRNA sequence. gb JK539290.1	1.0×10 <sup>-27</sup>	M0S837_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - F8	2.E-13	GSMUA_Achr6T26180_001~ Metallothionein-like protein type 3~ MT3A~ complete	2.E-171	MA4LIMFES003B_MA4LIMFES003B_B01_.b_00 9 MA4LIMFES Musa acuminata cDNA clone MA4LIMFES003B_MA4LIMFES003B_B01_.b_00 9 5', mRNA sequence. gb JK532596.1	1.0×10 <sup>-13</sup>	M0TAB3_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - G4	4.E-16	GSMUA_Achr4T14900_001~ Hypothetical protein~ CA2~ missing_functional_completeness	2.E-75	MA4LIMFES008B_F10 MA4LIMFES Musa acuminata cDNA clone MA4LIMFES008B_F10 5', mRNA sequence. gb JK537613.1	3.0×10 <sup>-15</sup>	M0SP05_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Carbonic anhydrase



**FIGURA 3.21 NÚMERO DE GENES ENCONTRADOS EN LOS CROMOSOMAS DE BANANO.** Se realizó un blast x la base de datos de *Banana Genome* para caracterizar la cantidad de genes que se encontraban en un mismo cromosoma. Chr: Cromosoma. Un\_random: Cromosoma no caracterizado. No hits found indica que no se encontró información en la base de datos



**FIGURA 3.22 UBICACIÓN DE LOS GENES EN LOS CROMOSOMAS DEL BANANO.** Chr Cromosoma. G grupo. Los colores de los grupos indican eventos de duplicación en el cromosoma

Fuente: <http://banana-genome.cirad.fr/advanced>

En el análisis bioinformático se evidenció la proteína a cual codifican los genes evaluados, entre ellos los cuatro genes del cual se realizó la PCR semi-cuantitativo y revelaron una sobre expresión en la relación de ‘*Calcutta-4*’ inoculado con ‘*Williams*’ inoculado. Estos genes son los siguientes:

SCPL18 el cual se encuentra con el código del CIBE – ESPOL como ESO1-B9 codifica a una proteína llamada Serina carboxipeptidasa –like y pertenece al grupo de acyltransferasas, esta proteína es requerida para la formación de compuestos antimicrobianos y para resistencia a enfermedades, existen diversos estudios en avena y *Arabidopsis thaliana* en cuales han probado la SCPL como formadores de compuestos que actúan como metabolitos secundarios. [60, 61, 63].

GRP107 está con el código del CIBE – ESPOL como ESO1-C10 pertenece al grupo de la familia GRP los cuales juegan un papel importante como el control de regulación hormonal en las vías de compuestos mensajeros, están acoplados a una proteína que implica la regulación del crecimiento de las raíces por lactonas N-acil-homoserina bacterianas (AHL) y juega un papel en la mediación de las interacciones entre las plantas y los microbios [62, 63]

MAF1 con el código CIBE – ESPOL como ESO2-A10 es un regulador de la transcripción que está involucrado en la regulación negativa de la transcripción del promotor del ARN polimerasa III, este se encuentra en 25 estructuras de la planta expresadas durante las etapas de crecimiento. Varios estudios con el MAF1 se han realizado en levaduras en los cuales han demostrado que este represor de la transcripción integra respuestas nutricionales y estrés por vías de señalización convergentes [63, 64].

NDEL1 con el código CIBE – ESPOL como ESO2-A11 es una proteína que no ha sido caracterizada en plantas pero según la información en TAIR codifica a una proteína cuya secuencia es similar a la antranilato N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase de *Dianthus caryophyllus* [63].



# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### 4.1 Conclusiones.

Se demostró mediante la elaboración de los bioensayos que existen diferencias significativas en la evolución de los síntomas de sigatoka negra causada por el hongo patógeno *M. fijiensis* entre las variedades 'Calcutta-4' y 'Williams' tanto entre las hojas 2 y entre las hojas 3.

Existe diferencias significativas en el número de estomas penetrados en la hoja 3 entre las variedades 'Calcutta-4' y 'Williams'.

Mediante la técnica de la PCR semi-cuantitativa se demostró que hay una sobre expresión en los cuatro genes analizados al llegar a los 15 dpi en la relación de 'Calcutta-4' inoculado con el patógeno y 'Williams' inoculado con el patógeno.

#### **4.2 Recomendaciones.**

Se recomienda realizar los bioensayos a una mayor concentración de conidios de *M. fijiensis* y utilizando diferentes variedades de banano.

Para el análisis de expresión de genes se recomienda realizar la técnica de la PCR en tiempo real.

Continuar con estudios de los genes para confirmar su funcionalidad.

# APÉNDICE

## APENDICE A

### PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ARN.

- ✓ Usar solo material y reactivos libre de RNAsa
- ✓ Use siempre guantes libres de polvo
- ✓ Preparar 5 ml de buffer de extracción fresco para cada gramo de tejido de hoja.
- ✓ DEPC+H<sub>2</sub>O: Agregar 1ml de DEPC a 1000ml de H<sub>2</sub>O, incubar durante la noche y luego autoclavar.

Componente	Solución Stock	Concentración final	Cantidad a usar
NaCl	4M	400mM	500 µl
Tris-HCl pH8.0	1M	10mM	50 µl
EDTA	500mM	2mM	20 µl
PVP		2%	100mg
β-Mercaptoethanol			50µl
H <sub>2</sub> O			→ Completar hasta 5 ml

1. Triturar 100-150mg de tejido en nitrógeno líquido, agregar 750ul de buffer de extracción.
2. Mezclar 2 veces durante 5 segundos en el vortex.
3. Adicionar 53 µl de SDS30% (2% conc. final) y 14.9 µl de Proteinasa K 20mg/ml (350 µg conc. Final); mezclar.
4. Incubar a 55°C durante 1 hora.

5. Centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 30 minutos y transferir el sobrenadante (SN) a 2 tubos eppendorf de 2ml.
6. Adicionar un volumen igual de phenol:cloroform:IAA (25:24:1)
7. Hacer Vortex durante 60 seg.
8. Centrifugar a max velocidad a 4°C durante 5min.
9. Repetir todo desde el paso 6
10. Adicionar un volumen igual de chloroform:IAA (24:1)
11. Vortex durante 60 seg y centrifugar a máxima velocidad a 4°C durante 5min.
12. Adicionar ½ volumen de 6M LiCl mezclar suavemente (NO vortex) y precipitar durante la noche a -20 °C o -80°C
13. Centrifugar a 12000rpm a 4°C durante 30 minutos.
14. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. [este sobrenadante puede ser utilizado para hacer extracción de ADN o smallRNA]
15. Lavar el pellet 3 veces con etanol al 70 % (es posible que el pellet este verde o amarillo) mezclar bien y centrifugar 5 min.
16. Disolver el pellet en 50 µl de H<sub>2</sub>O y medir la concentración

**Cantidad esperada:** 800 µg de RNA por gramo de tejido de hoja.

## APENDICE B

### Protocolo del tratamiento de la DNAsa

#### RQ1 RNase –Free DNase (cat #M6x01) PROMEGA

	Final concentración	Ejemplo
RNA	Max 10ug	30
DNase 2u/ul	2u/ugARN	10
Buffer 10x	1x	10
H2O (DEPC)		50
Volumen total		100

1. Incubar la mezcla durante 45 minutos a 37°C
2. Agregar un volumen igual de fenol:cloroformo:IAA. 25:24:1. Hacer vortex brevemente.
3. Centrifugar a 4°C, 13000rpm (Max velocidad), 10 min.
4. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Adicionar 1/10 volúmenes de 3M NaAc; 2.5 volúmenes de EtOH (100%) frio, mezclar suavemente NO hacer vortex.
6. Incubar toda la noche a -80°C.
7. Incubar 5 min en hielo.
8. Centrifugar 70 minutos a 13000rpm.
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con EtOH (70%) frio.
10. Centrifugar 15 min a 4°C, 13000rpm.
11. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet.
12. Resuspender en agua.
13. Cuantificar el ARN

### APENDICE C.

Evaluación de síntomas de *M. fijiensis* en los ensayos de invernadero.

Evaluación semanal de síntomas de *M. fijiensis* en las variedades de 'Williams' y 'Calcutta-4'.

CODIGO PLANTA <sup>a</sup>	SEMANAS*															
	0		1		2		3		4		5		6		7	
	02-ago		09-ago		16-ago		23-ago		30-ago		06-sep		13-sep		20-sep	
	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3
WP1.6dpiMf	0	0	1	1	1	1	3	3	3	4	1	4	5	5	5	5
WP2.6dpiMf	0	0	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	4	4	4
WP3.6dpiMf	0	0	1	2	1	2	2	3	3	3	3	4	4	5	5	5
WP1.9dpiMf	0	0	0	1	0	1	2	2	4	3	4	4	5	5	5	5
WP2.9dpiMf	0	0	1	1	3	1	3	2	4	3	4	4	5	4	5	5
WP3.9dpiMf	0	0	1	1	1	2	2	3	3	3	4	4	4	5	5	5
WP1.12dpiMf	0	0	2	2	2	3	3	3	4	5	5	5	5	5	5	5
WP2.12dpiMf	0	0	1	2	1	2	4	3	4	5	5	5	5	5	5	5
WP3.12dpiMf	0	0	1	2	1	2	3	3	4	4	5	4	5	5	5	5
WP1.15dpiMf	0	0	2	2	3	2	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5
WP2.15dpiMf	0	0	2	2	2	2	2	3	4	4	4	5	4	5	5	5
WP3.15dpiMf	0	0	2	3	3	3	3	3	5	5	5	5	5	5	5	5
CtaP1.6dpiMf	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CtaP2.6dpiMf	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CtaP3.6dpiMf	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CtaP1.9dpiMf	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2
CtaP2.9dpiMf	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CtaP3.9dpiMf	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
CtaP1.12dpiMf	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2
CtaP2.12dpiMf	0	0	1	0	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2
CtaP3.12dpiMf	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2
CtaP1.15dpiMf	0	0	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	2
CtaP2.15dpiMf	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CtaP3.15dpiMf	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

<sup>a</sup> W= 'Williams', Cta= 'Calcutta-4', dpi= Días post inoculado, Mf= *M. fijiensis*.

\*Datos tomados en el año 2012

**Evaluación semanal de síntomas de *M. fijiensis* en las variedades de  
'Williams' y 'Tuu Gia'.**

CODIGO PLANTA	* SEMANAS															
	0		1		2		3		4		5		6		7	
	11-ene		18-ene		25-ene		01-feb		08-feb		15-feb		22-feb		01-mar	
	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3	H2	H3
TUU GIA 1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TUU GIA 2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
WILLIAMS 1	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3	3	3	4	4	5
WILLIAMS 2	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
TUU GIA 3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TUU GIA 4	0	0	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
WILLIAMS 3	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	3	3	4	4	4	4
WILLIAMS 4	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
TUU GIA 5	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
TUU GIA 6	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
WILLIAMS 5	0	0	0	0	0	0	1	1	3	2	4	4	5	5	5	5
WILLIAMS 6	0	0	0	0	0	1	0	1	2	2	3	4	3	4	4	5

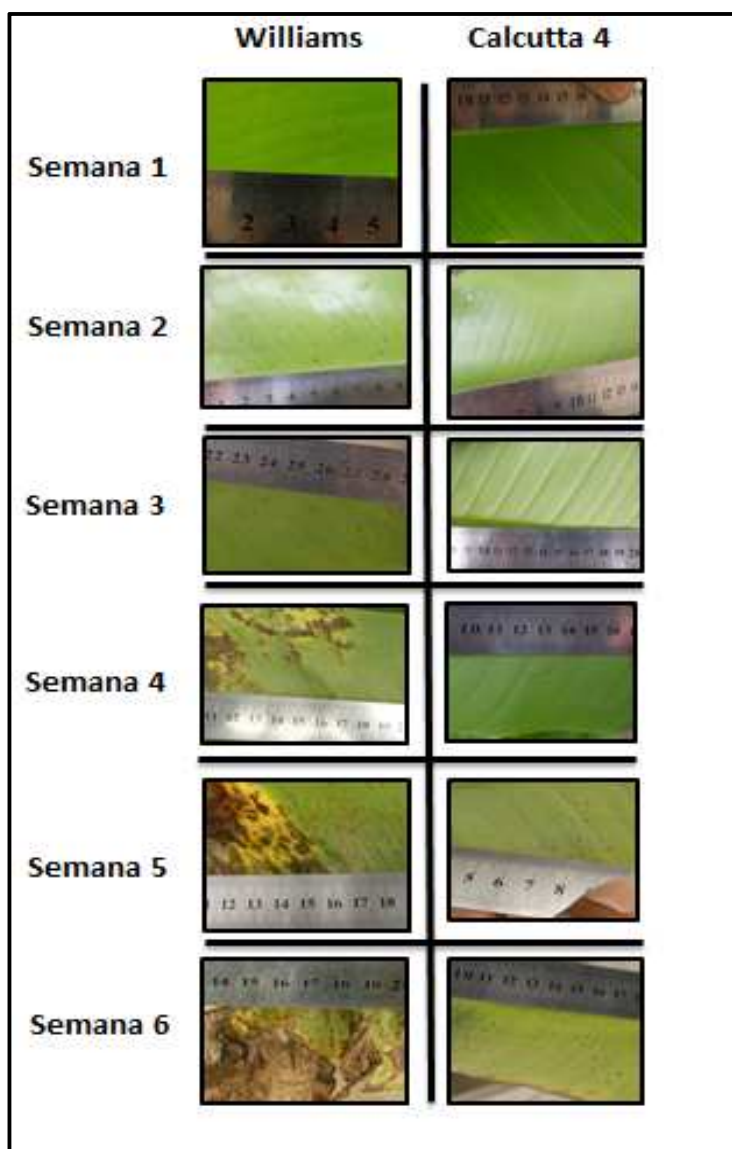
\*Datos tomados en el año 2013



## APENDICE D

Evolución de los síntomas de la sigatoka negra en variedades resistentes y susceptibles.

Ensayo – ‘Williams’ – ‘Calcutta’ – *M. fijiensis*



## APENDICE E

### Secuencia de Primers de genes candidatos a reistencia a sigatoka negra.

Nombre	Secuencia	T <sub>m</sub>	Tamaño del amplicón (pares de bases)
ESO1-B5F	AGATCCCATGATCTACAGTTTGGT	59.28	190
ESO1-B5R	AGCACAATACACATGTTTGACAAT	57.91	
ESO1-B9F	GCGTGGGAGAGCAAATACCA	60.39	121
ESO1-B9R	GCCCGAAGCCCAACATAATC	59.33	
ESO1-C3F	GGGTTTCCAGCGAATCCTTT	58.45	149
ESO1-C3R	TGACATACGCTATGGACAATCT	57.06	
ESO1-C7F	GGTAGGAACAGCATCTGGGA	58.80	100
ESO1-C7R	CCGATCTCTCAGCCCTTTCT	58.88	
ESO1-C8F	TCTCTCCTCGATGATGTTCTTG	57.35	135
ESO1-C8R	CTGCCCGAAGATGCAAACCTG	59.83	
ESO1-C9F	GACCAGCCCGAGAAGACAAG	60.39	147
ESO1-C9R	CGATTGGGATTGTGGTGATG	59.40	
ESO1-C10F	GAGACCGGACCCTTCATCAG	59.54	143
ESO1-C10R	GCCTTTCCGTCCGTCTTTGA	60.60	
ESO1-G10F	TAATCTGCATCGAGCTTCTTGAC	58.88	102
ESO1-G10R	AGGTTTGTGGTCTTGTTGTGA	57.92	
ESO1-E5F	CACCATTGAGGTACGGAGAAC	58.38	109
ESO1-E5R	GGGTCATCCAGACCATGTAGAG	59.63	
ESO2-A10F	TGCAAGCAAACCTGGGACAGAT	60.48	96
ESO2-A10R	AGGCGCTGAGTCACTATCAG	59.26	
ESO2-A11F	GATGTTTCGTGCCGATTTCCA	58.92	149
ESO2-A11R	ACTCCTTCTCCCACCACTCT	59.51	
ESO2-C8F	TCTCGGCAAATGTTCTTGTTCA	58.79	148
ESO2-C8R	CAATCCTGCAAATACAGGAGTAGT	58.57	

Tabla continua

ESO2-D3F	ACAGCTCTAGATGCCTTCTCAA	58.90	130
ESO2-D3R	CAATCACGATGGTCGAGCAAA	59.27	
ESO2-D6F	TCCAGTATCGTATGCTTCCCTTA	58.52	135
ESO2-D6R	GCCTCGTATCAGCAGAAGCTAA	60.22	
ESO2-D11F	CTCCATTGACTGTCCCATCTCA	59.50	127
ESO2-D11R	GGAAGACAGGCCTCGAACTG	60.39	
ESO2-D12F	TGCCGGAAATCCCGATTGAG	60.46	119
ESO2-D12R	ATTGATTGCCGAAGGGAAGATG	59.05	
ESO2-E7F	CCAAACCACAACATCACAGTCT	59.05	114
ESO2-E7R	GGCTGGGCTTCGTAGTTATC	58.13	
ESO2-F8F	ACACAACATGACTCAGCAAACA	58.98	121
ESO2-F8R	GCATGGAGTTCCACATCACTCA	60.62	
ESO2-G4F	GGCAGCATTAGTGTTGACTCTT	58.92	118
ESO2-G4R	TGAAGGCACTGATCACAACCA	59.86	

La tabla muestra las secuencia de los primers forward y reverse y el tamaño del amplicón de cada gen.  $T_m$  Temperatura de anillamiento.

## APENDICE F

### Base de datos de secuencias en la web

Base de Datos	Dirección en la WEB
Banana genome	<a href="http://banana-genome.cirad.fr/">http://banana-genome.cirad.fr/</a>
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
TAIR	<a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a>
UNIPROT	<a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a>

## APENDICE G

### BLAST de secuencias de los genes usados en el estudio (Banana Genome – NCBI).

Gen Code (BM - CIBE)	Blast X Banana Genoma		Blast X NCBI		Blastn NCBI (EST)	
	E VALUE	DESCRIPTION	E VALUE	DESCRIPTION	E VALUE	DESCRIPTION
ESO1 - B5	No hits found		No hits found		No hits found	
ESO1 - B9	3.E-43	GSMUA_Achr11T01090_001~ Serine carboxypeptidase-like 18~ SCPL18~ complete	3.E-11	serine carboxypeptidase, putative [Ricinus communis] ref XP_002510076.1	No hits found	
ESO1 - C3	1.E-73	GSMUA_AchrUn_randomT01190_001~ Ankyrin repeat domain-containing protein 2~ AKR2~ complete	3.E-56	ankyrin repeat domain-containing protein 2-like [Cicer arietinum] ref XP_004499676.1	1.E-145	[ MACVLIMFLS005D_E03_b_019 MACVLIMFLS Musa acuminata cDNA clone MACVLIMFLS005D_E03_b_019 5', mRNA sequence] gb JK544075.1
ESO1 - C7	No hits found		No hits found		6.E-84	[MUC4LC1010_D08_b_062. Musa acuminata leaves COLD stress Musa acuminata subsp. burmannicoides cDNA 5', mRNA sequence] gb DN239809.1
ESO1 - C8	2.E-44	GSMUA_Achr9T24740_001~ 22.3 kDa class VI heat shock protein~ HSP22.3~ modules	1.E-19	uncharacterized protein LOC100306244 [Glycine max] ref NP_001235938.1	2.E-13	[Embrapa_Mbalbisiana_PKW_Leaf004_E10_b Embrapa_Musa balbisiana_PKW_Leaf Musa balbisiana cDNA, mRNA sequence.] gb FL646411.1

Tabla continúa

ESO1 - C9	1.E-32	GSMUA_Achr8T32740_001~ V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit c1/c3/c5~ VHA-C1~ complete	8.E-26	putative. proteolipid subunit of vacuolar H+ ATPase, partial [Zea mays] gb AAA18550.1	0.E+00	MA4LIMFES006C_H04 MA4LIMFES Musa acuminata cDNA clone MA4LIMFES006C_H04 5', mRNA sequence. gb JK534160.1
ESO1 - C10	1.E-100	GSMUA_Achr5T08410_001~ Putative Protein GPR107~ Gpr107~ fragment	2.E-98	: protein GPR107-like [Vitis vinifera] ref XP_002274179.1	3.E-121	[ZO__Ef0005H12.f ZO__Ef Zingiber officinale cDNA clone ZO__Ef0005H12 5', mRNA sequence.] gb DY372004.1
ESO1 - G10	No hits found		No hits found		No hits found	
ESO1 - E5	3.E-57	GSMUA_Achr3G22290_001~ Putative disease resistance RPP13-like protein 1~ RGA1~ missing_completeness	1.E-56	NBS-LRR class resistance protein [Musa acuminata AAA Group] gb ABW96287.1	No hits found	
ESO2 - A10	2.E-26	GSMUA_Achr3T09560_001~ Putative Repressor of RNA polymerase III transcription MAF1 homolog~ MAF1~ fragment	6.E-22	hypothetical protein SORBIDRAFT_04g024970 [Sorghum bicolor] ref XP_002454124.1	9.E-88	Embrapa_Musa_ABB_Stressed_Cachaco_D152TF B Embrapa_Musa_Cachaco_ABB_Stressed Musa ABB Group cDNA, mRNA sequence. gb FL659918.1
ESO2 - A11	3.E-16	GSMUA_Achr6T12850_001~ Hypothetical protein~ Ndel1~ missing_functional_completeness	6.E-04	putative extracellular serine protease [Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis NCPPB 382] ref YP_001220798.1	No hits found	
ESO2 - C8	No hits found		No hits found		No hits found	
ESO2 - D3	5.E-94	GSMUA_Achr6T35290_001~ expressed protein~ mx~ complete	3.E-64	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100266617 [Vitis vinifera] ref XP_002282328.1	0.E+00	Embrapa_Mbalbisiana_PKW_Root_009_h01_b Embrapa_Musa balbisiana_PKW_Root Musa balbisiana cDNA, mRNA sequence. gb FL649572.1
ESO2 - D6	5.E-54	GSMUA_Achr8T20830_001~ Heat shock cognate 70 kDa protein~ HSP70~ complete	4.E-55	heat shock protein 70 [Nicotiana benthamiana] dbj BAD02271.1	0.E+00	EST1232150 ESTSYN-F Musa acuminata AAA Group cDNA clone pESTSYNF-5E19 5', mRNA sequence. gb ES431943.1

Tabla continúa

ESO2 - D11	5.E-92	GSMUA_Achr1T21370_001~ Transcription initiation factor IIB~ TFIIIB~ complete	4.E-93	unknown [Zea mays] gb ACF84713.1	0.E+00	MACVLIMFLS026D_F11 MACVLIMFLS Musa acuminata cDNA clone MACVLIMFLS026D_F11 5', mRNA sequence. gb JK545824.1
ESO2 - D12	1.E-28	GSMUA_Achr5T12030_001~ Putative LanC-like protein 2~ LanC2~ complete	6.E-22	lanC-like protein 2-like [Cicer arietinum] ref XP_004514463.1	5.E-178	MACVLIMFLS015A_H05 MACVLIMFLS Musa acuminata cDNA clone MACVLIMFLS015A_H05 5', mRNA sequence. gb JK545275.1
ESO2 - E7	1E-25	GSMUA_Achr2T14960_001~ Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic~ LHCA4~ complete	3E-27	unknown [Picea sitchensis] gb ACN40598.1	6E-126	MA4LIMFES006A_B10 MA4LIMFES Musa acuminata cDNA clone MA4LIMFES006A_B10 5', mRNA sequence. gb JK539290.1
ESO2 - F8	2.E-13	GSMUA_Achr6T26180_001~ Metallothionein-like protein type 3~ MT3A~ complete	8.E-10	metallothionein type 3 [Typha angustifolia] gb ACV51811.1	2.E-171	MA4LIMFES003B_MA4LIMFES003B_B01_b_009 MA4LIMFES Musa acuminata cDNA clone MA4LIMFES003B_MA4LIMFES003B_B01_b_009 5', mRNA sequence. gb JK532596.1
ESO2 - G4	4.E-16	GSMUA_Achr4T14900_001~ Hypothetical protein~ CA2~ missing_functional_completeness	9.E-09	carbonic anhydrase [Lemna minor] gb ACD10927.1	2.E-75	MA4LIMFES008B_F10 MA4LIMFES Musa acuminata cDNA clone MA4LIMFES008B_F10 5', mRNA sequence. gb JK537613.1

**BLAST de secuencias de los genes usados en el estudio (TAIR - UNIPROT)**

Gen Code (BM - CIBE)	Blast X TAIR		Blast Uniprot	
	E VALUE	DESCRIPTION	E VALUE	DESCRIPTION
ESO1 - B5	No hits found		6.1×10 <sup>-2</sup>	S3JWD7_KLEPN [PTS system cellobiose-specific transporter subunit IIA] [Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae B5055]
ESO1 - B9	3.E-06	[SCPL19, SERINE CARBOXYPEPTIDASE-LIKE 19, SINAPOYLGLUCOSE ACCUMULATOR 2, SNG2] AT5G09640.1	6.0×10 <sup>-45</sup>	MORNEO_MUSAM [Uncharacterized protein] [Musa Acuminata ]
ESO1 - C3	5.E-40	[ AFT, AKR2, AKR2A, ANKYRIN REPEAT-CONTAINING PROTEIN 2] AT4G35450.5	9.0×10 <sup>-88</sup>	MOU5D1_MUSAM [Uncharacterized protein] [Musa Acuminata ]
ESO1 - C7	2.E+00	[ Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein] AT3G06410.1	8.5×10 <sup>-1</sup>	C3Z107_BRAFL [Putative uncharacterized protein ]
ESO1 - C8	9.E-13	[HSP20-like chaperones superfamily protein ] AT5G54660.1	6.0×10 <sup>-52</sup>	MOU381_MUSAM [ Uncharacterized protein Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) ]

Tabla continúa

ESO1 - C9	2.E-22	[AVA-P1, VHA-C1, ATVHA-C1   ATPase, F0/V0 complex, subunit C protein] AT4G34720.1	3.0×10 <sup>-37</sup>	I1JSI4_SOYBN [ Glycine max (Soybean) (Glycine hispida)] Uncharacterized protein
ESO1 - C10	5.E-80	Lung seven transmembrane receptor family protein   AT5G18520.1	5.0×10 <sup>-122</sup>	MOSWS0_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO1 - G10	No hits found		No hits found	
ESO1 - E5	7.E-14	NB-ARC domain-containing disease resistance protein   >AT3G14470.1	3.0×10 <sup>-67</sup>	A9Y8Q4_MUSAC Musa acuminata AAA Group (dessert banana) NBS-LRR class resistance protein
ESO2 - A10	3.E-16	transcription regulators >AT5G13240.1	3.0×10 <sup>-29</sup>	M0SD73_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - A11	2.E+00	HXXXD-type acyl-transferase family protein >AT5G57840.1	4.0×10 <sup>-63</sup>	M0T6I4_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - C8	4.E+00	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) AT2G14870.1	No hits found	
ESO2 - D3	1.E-42	unknown protein; BEST Arabidopsis thaliana protein match is: unknown protein (TAIR:AT1G12530.1) >AT1G56420.1	3.0×10 <sup>-116</sup>	M0TCX2_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis)

Tabla continúa



ESO2 - D6	6.E-46	HSP70, ATHSP70   heat shock protein 70   >AT3G12580.1	1.0×10-63	K0A0D7_ELAGV Elaeis guineensis var. tenera (Oil palm) DnaK-type molecular chaperone hsp70 [Hsp70]
ESO2 - D11	7.E-64	Cyclin-like family protein >AT3G10330.1	1.0×10-111	MOS1U5_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - D12	1.E-18	GCL2   GCR2-like 2 >AT2G20770.1	4.0×10-30	MOSXT2_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - E7	2E-23	LHCA4, CAB4   light-harvesting chlorophyll- protein complex I subunit A4 >AT3G47470.1	1.0×10-27	MOS837_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - F8	2.E-07	MT3, ATMT3   metallothionein 3 >AT3G15353.1	1.0×10-13	MOTAB3_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Uncharacterized protein
ESO2 - G4	2.E-09	ATBCA3, BCA3   beta carbonic anhydrase 3 >AT1G23730.1	3.0×10-15	M0SP05_MUSAM Musa acuminata subsp. malaccensis (Wild banana) (Musa malaccensis) Carbonic anhydrase

## BIBLIOGRAFÍA

1. CEIRD. 2009. Perfil económico del banano en gerencia de investigaciones de mercados dominicana exporta. República Dominicana.
2. ARIAS P., C.D., PASCAL L., PILKAUSKAS P. 2004. La economía mundial del banano. Roma, Italia: FAO. 1985-2002.
3. LEDESMA E. 2011. Industria bananera ecuatoriana. AEBE.
4. HIDALGO M., A.T., RODRÍGUEZ W., SERRANO E. 2006. Efecto de la sigatoka negra sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). *Agronomía Costarricense*. 30(1): p. 35-41.
5. MERCHÁN V. 2002. Manejo integrado de plagas del plátano y el banano. XV Reunión Internacional ACORBAT. Medellín - Colombia.
6. MARTÍNEZ I., R.V., SOTO E., MURILLO G, GÚZMAN M. 2011. Manejo de la sigatoka negra en el cultivo del banano: proyecto demostrativo con

- implementación de BPA. CORBANA. Dirección de investigaciones sección fitopatología. Costa Rica.
7. KRUITER., A.H. 1989. El banano en el norte de la zona atlántica de Costa Rica. Costa Rica: CATIE.
  8. MARTILLO E., P.S. 2003. Situación de la sigatoka negra en el Ecuador: manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas en los trópicos, F.R. Galileo Rivas, Editor 2003, INIBAP: Guayaquil - Ecuador. p. 13-18.
  9. JONES. D.R. 1999. Diseases of banana, abacá, and enset. Wallingford, Oxon, UK ; New York: CABI Pub. xv, 544 p.
  10. ROBINSON J., V.G. 2011. Plátanos y bananas. Madrid - España: CAB International.
  11. DEGMAIR J., S.O. 2009. Cultivos transgénicos y biodiversidad: Impacto mundial de los cultivos modificados genéticamente, in NABU-Bundesverband, Alemania.
  12. COLLINGE., D.B., et al. 2010. Engineering pathogen resistance in crop plants: current trends and future prospects: annual review of phytopathology. 48(1): p. 269-291.
  13. YAORONG W., D.Z., JIANBIN L., YIYUE Z., CUIPING Y., BOJIAO Y., QINGZHEN Z., LING Z., YIN L., CHENGWEI Y., QI X. 2009. Dual

- function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res.* 19(11): p. 1279-1290.
14. PORTAL, O., et al. 2011. Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis* – banana interaction. *Plant Cell Reports.* 30(5): p. 913-928.
  15. KEMA., G.H. 2013. The genome sequence of the banana black sigatoka pathogen *Mycosphaerella fijiensis* Reveals an extraordinary species specific expansion and is applied to analyze avirulence and fungicide resistance. *Plant and Animal Genome.*
  16. BOLÍVAR., C.B. 2001. Cultivo del plátano y banano en quidío, PRONATTA. Córdoba - Quindío.
  17. LEÓN J. 1968. Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Primera ed. Textos y materiales de enseñanza. San José: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. 487p.
  18. SOTO G. 1999. Normativa nacional e internacioal para la producción orgánica y, o ambientalmente amigable de banano., in *Producción de banano orgánico y/o ambientalmente amigable*, Editors F.E.T. Rosales, S.C; Cerna, J. , INIBAP.: Costa Rica.
  19. STOOORVOGEL J., R.V. 1999. La agricultura de precisión en Banano, in *Producción de banano orgánico y/o ambientalmente amigable*. Editors F.E.T. Rosales, S.C; Cerna, J. Costa Rica.

20. AIJÓN C., A.C., 2007. Percepción del riesgo de los agroquímicos en la localidad de Basavibaso, Entre Ríos. Editors, R.B. Jian Martínez. Universidad Autónoma de Barcelona - Facultad de Ciencias Ambientales: Bellaterra - Barcelona - España.
21. AVALOS C. 2009. El polémico uso de agroquímicos, in ECOLOGÍA, Revista Generación. p. 10 - 15.
22. ORTIZ J., M.G., VÁZQUEZ N., AGUILAR M. 2002. Transformación genética de banano (cv Gran enano) y platano (cv Curraré) para introducir resistencia a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Cartagena - Colombia.
23. SANTAMARTA J. 2004. Los Transgénicos en el mundo. World Watch.
24. SALVADOR, E.A. 2000. La teoría del ciclo económico bananero y el fenómeno de el niño: el caso del Ecuador desde 1948 al 2000. UEES.
25. VILLACÍS B. 2009. Análisis del sistema agroalimentario del banano en el Ecuador. INEC - Ecuador.
26. VILEMA F. 2010. Banana republic: un análisis de competitividad entre Ecuador y países de Asia Pacífico. CEAP: Ecuador.
27. CORPEI. 2011. El reporte económico: análisis sectorial de la actividad bananera. UEES: Ecuador.

28. MONTAÑO C., 2010. Ecuador y el caso del banano. AFESE. p. 133-149.
29. AEBE. 2012. Estadísticas, exportaciones mensuales, exportaciones por destino, compañías exportadoras acumulado. Ecuador. Disponible en World Wide Web: <http://www.aebe.com.ec/Desktop.aspx?Id=142>.
30. INEC. 2012. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua ESPAC. Disponible en World Wide Web: [http://www.ecuadorencifras.com/cifrasinec/main.html?TB\\_iframe=true&eight=530&width=1100](http://www.ecuadorencifras.com/cifrasinec/main.html?TB_iframe=true&height=530&width=1100).
31. PROECUADOR. 2011. Análisis sectorial de banano: Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones, Ministerio de Relaciones Exteriores Comercio e Integración.
32. SICA. 2000. Estudio de mercado del plátano: III Censo Agropecuario . Ecuador. Resumen ejecutivo disponible en World Wide Web: [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/est\\_peni/DATOS/COMPONENT,2000](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/est_peni/DATOS/COMPONENT,2000)).
33. CUÉLLAR A., E.Á.C., Castaño J. 2011. Evaluación de resistencia de genotipos de plátanos y banano a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet.). Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. 64(1): p. 5853-5865.
34. AGUIRRE M., J.C., ZULUAGA L. 2003. Método rápido de diagnóstico de *Mycosphaerella musicola* Leach y *M. fijiensis* Morelet, agentes

- causantes de las sigatokas amarilla y negra. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 27(105): p. 619-623.
35. ALVARADO A. 2007. Guía práctica de plagas y enfermedades en plátano y guineo: servicio de extensión agrícola: Puerto Rico.
  36. ARAUJO D. D.R., SANABRIA M. 2008. Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum* F. SP. Cubense, causante del mal de panamá a algunos extractos vegetales y fungicidas., in Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. SOVEFIT: Venezuela.
  37. GARCÉS E., M.O., BAUTISTA G., VALENCIA H. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.: Colombia.
  38. TAPIERO A., A.M., MILENA S. 2007. Dispersión de *Ralstonia solanacearum* en suelos cultivados con plátano en el Piedemonte Llanero. Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 8(1): p. 52-60.
  39. THURSTON, H.D. 1989. Enfermedades de cultivos en el trópico. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales. VIII, 232 p.
  40. MARTÍNEZ I., M.G. 2011. Moko o marchitamiento bacteriano del banano y plátano (*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al.), in Proyecto demostrativo con implementación de BPA en el cultivo del banano,

CORBANA, Dirección de Investigaciones Sección Fitopatología: Costa Rica.

41. OBREGÓN M, P.R., MORALES J., SALAZAR M. 2008. Hospedantes de *Ralstonia solanacearum* en plantaciones de banano y plátano en Colombia. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*. 61(2): p. 4518-4526.
42. HAYWARD., A.C. 2006. Pudrición de las frutas de banano causadas por *Ralstonia solanacearum* raza 2: materias de nomenclatura, transmisión y control. *Info MUSA* . 15(1 - 2): p. 7-10.
43. OSCAR MOLINA, J.C. 2003. Análisis de algunos componentes de resistencia en los híbridos de banano y plátano FHIA 01, FHIA 17 Y FHIA 21 a la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* morelet) Y amarilla (*M. musicola* Leach). *rev. acad. colomb. cienc.* 27(103 ): p. 181-190.
44. VICENTE L, M.P. 2003. Epidemiología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en clones híbridos de la FHIA con resistencia parcial, in Manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos F.R. Galileo Rivas, Editor. INIBAP Guayaquil - Ecuador. p. 35 - 36.
45. COLMENARES M., M.G., GIMÉNEZ C. 2008. Identificación de genes análogos de resistencia en una biblioteca genómica BIBAC de *Musa acuminata* (AA) cv. 'Tuu Gia'. *CIENCIA*. 16(3): p. 303 - 309.



46. TORRES J, R., H. A, E., RODRÍGUEZ., ARANGO R. 2009. Aspectos bioquímicos de la resistencia del banano (*Musa acuminata*) al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. TUMBAGA. 4: p. 85 - 96.
47. VAN BRUNSCHOT S., A.D. 2009. Diagnostic Methods for Black Sigatoka *Mycosphaerella fijiensis*. PaDIL - plant bio security toolbox. p. 1-37.
48. ROSALES F., S.B., POCASANGRE L. 2004. Producción y comercialización de banano orgánico en la región del alto beni, in Manual práctico para productores. INIBAP: Sapecho, Alto Beni, Bolivia.
49. AGRIOS, G.N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. XXIII, 922 p.
50. MAGAP. 2012. MAGAP fortalece entrega de insumos para fumigar plantaciones bananeras. D.N.d. Comunicación. Ecuador. Disponible en World Wide Web. <http://www.agricultura.gob.ec/magap-fortalece-entrega-de-insumos-para-fumigar-plantaciones-bananeras/>:
51. MOURICHON X., J.C., FOURÉ E. 1997. Enfermedades de *Musa* : Hoja divulgativa N°8, enfermedades de sigatoka. INIBAP.
52. RIVEROS A. 2010. Inducción de resistencia en plantas, interacción: plantas-patógeno. San José, Costa Rica: IICA. 261.

53. ORDEÑANA K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas, Costa Rica. 63: p. 22 - 32.
54. VIVANCO J, E.C., LOYOLA V, FLORES H. 2005. Mecanismo químicos de defensa en las plantas. Investigacion y ciencia.
55. CRUZ M., Y.H., RIVAS E. 2006. Mecanismos de resistencia de las plantas. ciencia y tecnología. 10(29): p. 45 - 54.
56. GARCÍA E., E.L. 2004. Genes de resistencia a enfermedades en plantas. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. 22(3): p. 414 - 422.
57. SLUSARENKO, A.J., FRASER R AND LOON L. 2000. Mechanisms of resistance to plant diseases. Dordrecht ; Boston: Kluwer Academic Publishers. vi, 620 p.
58. JORDÁN M., J.C. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico, in Fisiología Vegetal (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.), U.d.L. Serena. La Serena - Chile.
59. MOGOLLÓN A., J.C. 2011. Efecto de inductores de resistencia en plántulas de plátano dominico-hartón (*Musa balbisiana* aab) contra *Mycosphaerella* spp. Rev. Acad. Colomb. Cienc, 2011. 35(137): p. 463 - 471.

60. MUGFORD S., QI X., BAKHT S., HILL L., WEGEL E., HUGHES R., PAPADOPOULOU K., MELTON R., PHILO M., SAINSBURY F., LOMONOSSOFF G., DEB ROY A., GOSS E., OSBOURN A. 2009. A Serine Carboxypeptidase-Like Acyltransferase Is Required for Synthesis of Antimicrobial Compounds and Disease Resistance in Oats. *Plant Cell.*, 21: 2473-2484.
61. LEHFELDT C., SHIRLEY A., MEYER K., RUEGGER M., CUSUMANO J., VIITANEN P., STRACK D., CHAPPLE C. 2000. Cloning of the SNG1 Gene of Arabidopsis Reveals a Role for a Serine Carboxypeptidase-like Protein as an Acyltransferase in Secondary Metabolism *Plant. Cell.*, 12: 1295-1306.
62. JASON G., KRUPNICK., BENOVIC J. 1998. The role of receptor kinases and arrestins in g protein–coupled receptor regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.*, Vol. 38: 289 -319.
63. SWARBRECK D., WILKS C., LAMESCH P., BERARDINI T., GARCIA M., FOERSTER H., LI D, MEYER T., MULLER R., PLOETZ L, RADENBAUGH A., SINGH S., SWING V., TISSIER C., ZHANG P., HUALA E. 2007. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. Carnegie Institution, Department of Plant Biology, 260 Panama St., Stanford, CA 94305, USA.

64. IAN W., ROBYN M. 2007. Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends in Biomedical Sciences.*, Vol 32: 51 – 53.
65. JIMENEZ M., VANDER L., NEIRYNCK H., RODRIGUEZ H., RUIZ O., SWENNEN R. 2007. Organic banana production in Ecuador: Its implications on black Sigatoka development and plant–soil nutritional status. *Renewable Agriculture and Food Systems*: 22(4); 297-306.
66. ALVARADO Y.,LEIVA M.,DITA M.,ACOSTA M., CRUZ M.,PORTAL N.,GOMEZ R.,GARCIA L.,BERMUDEZ I.,AND PADRÓN J. 2003. Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis* Jacome L., Lepoivre P., Marin D., Ortiz R., Romero R. and Escalant J.V. *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook*.Montpellier,France, INIBAP.
67. FULLERTON R.A. Y OLSEN T.L. 1995. Pathogenetic Variability in *Mycosphaerella Fijensis* Morelet, cause Sigatoka in banana Plantain .*New Zealand Journal Crop Horticultural Science* 23,39-48.