



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**ESTUDIOS MOLECULARES EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO-  
BIOFERTILIZANTE**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Magister en  
Ciencias en Biotecnología Agrícola, Mención en Ingeniería Genética y  
Cultivo de Tejidos**

Presentado por:

Tatiana Paola Chávez Navarrete

Guayaquil - Ecuador

2018

## AGRADECIMIENTOS

A mi compañero de vida y fiel apoyo Eduardo Sánchez, a mis compañeros y amigos en el laboratorio de Biología Molecular Liliana Villao, Christian Romero, Luis Galarza y Ricardo Pacheco por toda su ayuda brindada en el desarrollo de esta tesis, al CIBE por permitirme realizar mi tesis de maestría en el centro. En especial a mi tutor de tesis Efrén Santos por su guía en el desarrollo de este proyecto.

## DEDICATORIA

A mi familia y en especial a mi hijo quien desde antes de nacer fue un motor para continuar creciendo personal y profesionalmente.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

---

[Ramón Espinel Ph. D.]  
DECANO O DELEGADO

---

[Efrén Santos Ordoñez Ph. D.]  
DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

---

[Eduardo Sánchez Timm Ph. D.]  
CO-DIRECTOR DE PROYECTO DE TITULACIÓN

---

[Luis Galarza Romero Ph. D.]  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 1

---

[José Flores Ph. D.]  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL 2

## DECLARACIÓN EXPRESA

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

Tatiana Chávez

## GLOSARIO

**Biol:** fertilizante biológico desarrollado a partir de la fermentación anaerobia de residuos orgánicos en presencia de microorganismos.

**Bio-fertilizante:** está definido por una fertilización en base a productos de origen orgánico, que posee microorganismos benéficos del suelo, en especial bacterias y/o hongos, los cuales viven en simbiosis con las plantas, de esta manera ayudan a su nutrición y crecimiento, además de ser mejoradores de suelo.

**Bio-estimulante:** son sustancias nutritivas que contienen compuestos y/o microorganismos asociados, que promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas, además de mejorar su metabolismo, que permite que puedan ser más resistentes ante condiciones adversas, como sequías, ataques de plagas y más.

**Biocontroladores:** El control biológico se define como una actividad en la que se manipulan una serie de enemigos naturales.

**Reacción de fenton:** es un proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales altamente reactivos del hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ )

## INDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>I</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>II</b>
<b>TRIBUNAL DE GRADUACIÓN.....</b>	<b>III</b>
<b>DECLARACIÓN EXPRESA.....</b>	<b>IV</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>V</b>
<b>INDICE GENERAL.....</b>	<b>VI</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XI</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	2
1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	2
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>4</b>
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 BANANO, <i>MUSA ACUMINATA</i> (VAR. "WILLIAMS" AAA).....	5
2.1.1 TAXONOMÍA BANANO.....	5
2.1.2 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	5
2.1.3 MEJORAMIENTO DEL CULTIVO.....	6
2.1.3.1 MEJORAMIENTO CONVENCIONAL.....	6
2.1.3.2 MEJORAMIENTO POR INGENIERÍA GENÉTICA.....	6
2.1.4 PRINCIPALES ENFERMEDADES.....	7
2.1.4.1 CAUSADAS POR HONGOS.....	7
2.1.4.2 CAUSADAS POR BACTERIAS.....	8
2.1.4.3 CAUSADAS POR VIRUS.....	8
2.2 SIGATOKA NEGRA, <i>PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS</i> .....	8
2.2.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	8
2.2.2 CONTROL.....	8
2.3 BIOFERTILIZANTES/BIOESTIMULANTES.....	9
2.3.1 BIOL.....	10
2.4 SISTEMAS DE DEFENSA DE LAS PLANTAS HACIA ATAQUES BIÓTICOS.....	10
2.4.1 RESPUESTA HIPERSENSITIVA (HR).....	11
2.4.2 ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS; REACTIVE OXYGEN SPECIES).....	11
2.4.3 FORTIFICACIÓN DE LA PARED CELULAR.....	11
2.4.4 ÁCIDOS BENZOICOS (BA) Y SALICÍlicos (SA).....	12
2.4.5 PROTEÍNAS DE RELACIONADAS A PATÓGENOS (PR) Y OTRAS PROTEÍNAS RELACIONADAS A DEFENSA.....	12
2.4.6 SUPERFAMILIA DE PROTEÍNA DE RECEPTOR DE QUINASA (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASES; RLKS).....	12
2.4.7 LIPOOXIGENASAS (LOX).....	12
2.4.8 FITOLEXINAS.....	12

<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>13</b>
3. METODOLOGÍA .....	14
3.1 FERTILIZACIÓN DE PLANTAS DE BANANO E INFECCIÓN CON <i>P. FIJENSIS</i> .....	14
3.1.9 ENSAYO 1: APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE BIOL EN HOJAS DE BANANO .....	14
3.1.10 ENSAYO 2: APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE BIOL DIRECTO A SUSTRATO DE PLANTAS BANANO PREVIAMENTE INFECTADOS CON <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> .....	14
3.1.11 ENSAYO 3: APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE BIOL EN HOJAS DE BANANO PREVIAMENTE INFECTADAS CON <i>PSEUDOCERCOSPORA FIJENSIS</i> .....	15
3.2 CONDICIONES DEL BIOFERTILIZANTE .....	15
3.3 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DEL HONGO <i>PSEUDOCERCOSPORA FIJENSIS</i> .....	15
3.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SEVERIDAD .....	16
3.5 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS .....	17
3.6 EXTRACCIÓN DE ARN .....	17
3.7 SÍNTESIS DE ADNc.....	17
3.8 GENERACIÓN DE LIBRERÍA GENÉTICA .....	18
3.9 CLONACIÓN Y OBTENCIÓN DE EXPRESSED SEQUENCE TAGS (EST) .....	18
3.10 SECUENCIACIÓN DE ESTs AISLADOS .....	19
3.11 DISEÑO DE PRIMERS.....	19
3.12 GENERACIÓN Y ANÁLISIS DE QPCR .....	19
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>20</b>
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
3.13 ANÁLISIS FISIOLÓGICOS.....	21
4.1.1 ENSAYO 1, APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE BIOL EN HOJAS DE BANANO: .....	21
4.1.2 ENSAYO 2, APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE BIOL EN SUSTRATO DE PLANTAS DE BANANO INFECTADAS CON <i>P.</i> <i>FIJENSIS</i> 23	
4.1.3 ENSAYO 3, APLICACIÓN FOLIAR DE BIOL EN PLANTAS DE BANANO PREVIAMENTE INOCULADAS CON <i>P.</i> <i>FIJENSIS</i> 26	
4.2 ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE SEVERIDAD.....	28
4.3 DETERMINACIÓN DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES .....	29
4.3.1 IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS .....	29
4.3.1.1 ENSAYO 1, APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE BIOL EN HOJAS DE BANANO: .....	29
4.3.1.2 ENSAYO 2, APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE BIOL EN SUSTRATO DE PLANTAS DE BANANO INFECTADAS CON <i>P. FIJENSIS</i> .....	31
4.3.1.3 ENSAYO 3, APLICACIÓN FOLIAR DE BIOL EN PLANTAS DE BANANO PREVIAMENTE INOCULADAS CON <i>P.</i> <i>FIJENSIS</i> 33	
4.3.2 ANÁLISIS DE SOBREENPRESIÓN DE GENES .....	35
4.3.2.1 ENSAYO 1, APLICACIÓN DE BIOFERTILIZANTE BIOL EN HOJAS DE BANANO: .....	35
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERENCIA .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>46</b>



## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1:</b> ESCALA DE ÍNDICE DE SEVERIDAD BASADA EN GAULH Y MODIFICADA POR STOVER. ....	<b>16</b>
---	-----------

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> RELACIONES DE CRUZAMIENTOS MÁS COMUNES DE MUSASEAS PARA EL CONSUMO .....	5
<b>FIGURA 2:</b> REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESCALA DE GAUHL'S MODIFICADA POR STOVER USADA PARA LA EVALUACIÓN DE SIGATOKA NEGRA.....	16
<b>FIGURA 3:</b> ESQUEMA DE LA GENERACIÓN DE LIBRERÍAS GENÉTICAS MEDIANTE TÉCNICA SSH PARA LOS DISTINTOS ENSAYOS REALIZADOS. ....	18
<b>FIGURA 4:</b> CONTENIDO DE CLOROFILA Y PORCENTAJE DE ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA PARA EL ENSAYO 1 .....	21
<b>FIGURA 5:</b> ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA Y EL CONTENIDO DE CLOROFILA PARA EL ENSAYO 1. ....	22
<b>FIGURA 6:</b> PROBABILIDAD DE EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO PARA EL ENSAYO 1.....	23
<b>FIGURA 7:</b> CONTENIDO DE CLOROFILA Y PORCENTAJE DE ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA PARA EL ENSAYO 2. ....	24
<b>FIGURA 8:</b> ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA Y EL CONTENIDO DE CLOROFILA PARA EL ENSAYO 2. ....	24
<b>FIGURA 9:</b> PROBABILIDAD DE EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO PARA EL ENSAYO 2. ....	25
<b>FIGURA 10:</b> CONTENIDO DE CLOROFILA Y PORCENTAJE DE ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA PARA EL ENSAYO 3. ....	26
<b>FIGURA 11:</b> ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LA ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA Y EL CONTENIDO DE CLOROFILA PARA EL ENSAYO 3. ....	27
<b>FIGURA 12:</b> PROBABILIDAD DE EVOLUCIÓN EN EL TIEMPO PARA EL ENSAYO 3.....	28
<b>FIGURA 13:</b> ÍNDICE DE SEVERIDAD DE INFECCIÓN. ....	29
<b>FIGURA 14:</b> GRAFICO DEL RESULTADO DE LAS SECUENCIAS ANOTADAS SEGÚN LA BASE DE DATOS USADA (BLAST2Go) PARA EL ENSAYO 1. ....	31
<b>FIGURA 15.</b> GRAFICO DEL RESULTADO DE LAS SECUENCIAS ANOTADAS SEGÚN LA BASE DE DATOS USADA (BLAST2Go) PARA EL ENSAYO 2. ....	33
<b>FIGURA 16.</b> GRAFICO DEL RESULTADO DE LAS SECUENCIAS ANOTADAS SEGÚN LA BASE DE DATOS USADA (BLAST2Go) PARA EL ENSAYO 3. ....	34
<b>FIGURA 17:</b> ANÁLISIS DE PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES ESCOGIDOS EN EL ENSAYO 1 .....	36

## ABREVIATURAS

- ARN:** Ácido Ribonucleico  
**ARNm:** ARN mensajero  
**ADN:** ácido desoxirribonucleico  
**ADNc:** ADN complementario  
**BA:** Ácido Benzoico  
**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool  
**BLASTx:** Generación de BLAST con base de nucleótidos en proteínas  
**BLASTn:** Generación BLAST nucleótidos-nucleótidos  
**DEPC:** Pirocarbonato de dietilo (por sus siglas en inglés, Diethyl pyrocarbonate)  
**EMS:** ethyl methyl sulphonate  
**EST:** Expressed sequence tag  
**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura  
**FRAC:** Fungicide resistance Action Committee  
**HR:** Respuesta hipersensitiva  
**JA** ácido jasmónico  
**LOX:** Lipooxigenasas  
**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica  
**PSB:** Phosphorus solubilizing biofertilizer  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PGPR:** Plant growth-promoting rhizobacteria  
**PR:** Proteínas de Relacionadas a Patógenos  
**PVP:** Polyvinylpyrrolidone  
**qPCR:** PCR cuantitativa  
**RLKs:** receptor-like protein kinases  
**ROS:** Reactive Oxygen Species  
**RT-PCR:** Transcripción inversa – Reacción en cadena de la polimerasa  
**SA:** Ácido Salicílico  
**SBI:** sterol biosynthesis inhibitors  
**SOD:** superóxido dismutasa  
**SSH:** por sus siglas en inglés, Suppression subtractive hybridization, hibridación sustractiva por supresión  
**VAM:** Vesicular-Arbuscular Micorrhizae

## RESUMEN

El cultivo de banano posee un importante valor económico en Ecuador debido a que representa uno de los productos de mayor exportación para el país. La producción está altamente afectada debido a enfermedades causadas por diferentes patógenos, los cuales no solo afectan la producción, sino que además los costos de manejo incrementan los gastos. Principalmente, estas enfermedades son controladas mediante el uso de aplicaciones químicas, lo que incrementa no solo la contaminación ambiental sino también la pérdida de sensibilidad de estos patógenos a los pesticidas, y en consecuencia se incrementan los ciclos de aplicación de dichos controles. Esta situación ha llevado a la necesidad de que exista un control de enfermedades diferente, que minimice los daños que se producen a nivel ambiental, económicos y de resistencia. Se proponen alternativas ambientalmente amigables, como el uso de fertilizantes o estimulantes de fuentes orgánicas. Con incrementos en el crecimiento y en autodefensa en la planta, que no generen daños ambientales. Dentro del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador se han realizado pruebas para el diseño de un biofertilizante ideal con capacidad de cumplir con los requerimientos necesarios, denominado Biol. Este biofertilizante foliar líquido es preparado a partir de la fermentación anaerobia de microorganismos, en conjunto con residuos orgánicos (desechos de plantas, materia orgánica de animales, minerales y otros). En este estudio se realizaron análisis moleculares y fisiológicos en plantas que fueron tratadas con biol y con inoculaciones con *P. fijiensis* para determinar el patrón de respuesta existente para los cambios en el crecimiento de la planta como la respuesta hacia ataques de patógenos. Se usaron plantas de banano en invernadero, para el primer experimento fueron tratadas con biol y los dos experimentos siguientes fueron plantas de banano infectadas con *P. fijiensis* y con aplicaciones consecutivas de biol en contraste con plantas sin aplicación de biol. Para los análisis fisiológicos se determinaron los porcentajes del índice de estabilidad de la membrana y contenido de clorofila. Se obtuvo para este parámetro un mayor porcentaje para aquellos tratamientos con aplicación de biol en presencia de *P. fijiensis* que aquellos que no se aplicaron biol, lo que está altamente relacionado al cambio en el aumento y asimilación de CO<sub>2</sub>. Para el contenido de clorofila total los ensayos con biol mantuvieron el contenido de manera estable en el tiempo, a diferencia de aquellas que no fueron tratadas con el biofertilizante. Estos resultados son asociados a posibles resultados de mejoras en crecimiento y fortificación de la planta. El análisis molecular, realizado mediante la generación de librerías genéticas a partir de ARNm, usando el método *Suppression Subtractive Hybridization* (SSH), obteniendo un total de 384 ESTs para cada librería realizada. Demostró que esta aplicación de biol indujo a la activación y sobreexpresión de genes involucrados en rutas metabólicas para crecimiento y respuestas hacia ataques de patógenos y estrés abiótico en las plantas.

## **CAPÍTULO I**

## 1. Introducción y objetivos

### 1.1 Antecedentes y justificación

El banano es uno de los productos de mayor consumo a nivel mundial, ocupando el cuarto puesto después de arroz, maíz y trigo (ProEcuador, 2013). En Ecuador, el banano junto con el cacao, arroz, maíz y palma africana son los cultivos con mayor cantidad hectáreas cultivadas. En el caso del cultivo de banano, el 87.14% de la producción en el Ecuador se exporta, representando el 36.6% de la exportación a nivel mundial de banano, lo que lo sitúa como el mayor exportador a nivel mundial para el año 2015, y el sexto productor a nivel mundial (Anexo 1)(FAO, 2015). Además, el banano del Ecuador posee el mayor nivel de aceptación internacional, lo que posiciona a Ecuador como uno de los países de mayor importancia en el cultivo de esta fruta tanto para la economía interna como para la distribución de este producto de manera externa (INEC, 2009; ProEcuador, 2013). Por este motivo, el banano es considerado uno de los principales productos de exportación y consumo interno en el país. Este cultivo enfrenta grandes problemáticas, una de estas es el control de los ataques de diversos patógenos que lo afectan. Con casos históricos como el que sufrió el cultivo con una de las mayores devastaciones, provocada por la infección de *Fusarium oxysporum* f. sp. Raza 1, la cual acabó con la variedad más importante (“Gros Michel”) a mediados del siglo pasado en Ecuador y en el mundo, obligando a los agricultores a reemplazar esta variedad por otras del subgrupo Cavendish (grupo genómico AAA) (Sotomayor, 2012). Otro patógeno importante que genera gran problemática en el cultivo es el hongo ascomiceto *Pseudocercospora fijiensis* Morelet, agente causal de la enfermedad Sigatoka Negra. El control de este patógeno incrementa no solo los costos de producción (hasta en un 40%), sino que la implementación de medidas de control convencionales a gran intensidad, disminuyen la efectividad de los productos, por lo que los productores deben incrementar los ciclos de aplicación para reducir la incidencia de la enfermedad en campo. Como resultado, existe un incremento de la contaminación ambiental y degradación del suelo. Muchos problemas radican en que los residuos de estas moléculas pueden permanecer por largos periodos de tiempo en el área aplicada (Russell, 2009).

La generación de una agricultura segura y amigable con el ambiente se ha intensificado en los últimos años, lo que ha incrementado la demanda de fertilizantes y controles orgánicos o ambientalmente amigables como una alternativa al uso de agroquímicos (Bhardwaj, *et. al.* 2014). Diferentes estudios demuestran que la utilización de fertilización química, si bien incrementa el vigor de las plantas, también deteriora el suelo en usos extendidos, mientras que manejos de plantaciones con bio-fertilización, incrementan la producción en plantas sin deteriorar el suelo luego de largos periodos de uso (Rajasekaran, Sundaramoorthy, & Sankar Ganesh, 2015). Demostrando así que, el uso de biofertilizantes tiene un efecto positivo en plantas durante ensayos de sequía en conjunto con nano óxidos, lo cual puede decrecer el efecto de la sequía en las plantas (Babaei, Seyed Sharifi, Pirzad, & Khalilzadeh, 2017). De esta manera, biofertilizantes con elevadas concentraciones del microbioma generan un incremento en la productividad de las plantas (ProEcuador, 2013). Mostrando diferentes mecanismos

moleculares como resultado de esta relación, como el de bacterias que metabolizan triptófano para obtener ácido indolacético (un tipo de auxina relacionado a un fototropismo positivo) (Bhardwaj et al., 2014). Otros estudios han demostrado que biofertilizantes que contienen mezclas de *Azospirillum* y Micorrizas Vesiculares y Arbusculares (VAM, en sus siglas en ingles), generan una activación de las señales de rutas metabólicas de transducción conocidas como rutas de simbiosis común (SYM) (Kosuta et al., 2003; ProEcuador, 2013). Adicionalmente, activación de rutas metabólicas asociadas a resistencia contra patógenos de las plantas, como el ácido salicílico, jasmónico, y rutas que promueven el crecimiento de las plantas (Backman & Sikora, 2008; Kosuta et al., 2003); por lo que el uso de consorcios de organismos vivos en biofertilizantes aumentaría tanto el crecimiento de la planta y, en algunos casos, la respuesta a patógenos.

La obtención de biofertilizantes mediante fermentación anaerobia de residuos orgánicos vegetales y animales es una metodología usada para la generación del biofertilizante denominado biol. En el presente estudio se usó dicho biofertilizante, para el cual se realizaron análisis moleculares y fisiológico de plantas de banano en tratamientos con aplicaciones directas al sustrato en el cual está sembrada la planta y a las hojas de las plantas infectadas con *Pseudocercospora fijiensis*, con la finalidad de determinar la interacción planta-biofertilizante-patógeno, a través del análisis de expresión diferencial de genes.

## **1.2 Objetivo general**

Identificar genes que presenten una expresión diferencial durante las interacciones banano-biol y banano-biol-*Pseudocercospora fijiensis*, mediante la generación de librerías genéticas usando la técnica hibridación sustractiva por supresión (SSH), con la finalidad de determinar a nivel molecular la interacción entre estos componentes asociándolas a posibles respuestas fisiológicas.

## **1.3 Objetivos específicos**

- a) Medir las respuestas fisiológicas de las plantas sometidas a las diferentes interacciones Biol-banano y biol-banano-*P. fijiensis* mediante ensayos controlados, para establecer sus efectos en la planta.
- b) Identificar genes sobre-expresados en plantas de banano sometidas a la interacción Biol-Banano y Biol-Banano-*P. fijiensis*.
- c) Determinar la expresión diferenciada en genes involucrados en la interacción Banano-Biol.
- d) Establecer las posibles funciones biológicas de genes involucrados en la interacción planta-patógeno-biofertilizante mediante análisis *in silico* de secuencias.

## **CAPÍTULO II**



## 2. Marco Teórico

### 2.1 Banano, *Musa acuminata* (Var. “Williams” AAA)

#### 2.1.1 Taxonomía Banano

El banano pertenece al género *Musa*, derivado del nombre arábico “planta” (mouz) que se transformó a musa en honor a Antonius Musa, físico del primer emperador de Roma. Mientras que el término banana es derivado de la palabra árabe *banan* (dedos). Este género pertenece a la familia de las Musaceae, que incluyen al menos dos géneros adicionales (*Ensete* y *Musella*) (OECD, 2009). Para este género se han descrito alrededor de 60 especies monocotiledóneas silvestres, donde las especies *Musa acuminata* Colla ( $2n=2x=22$ , Genoma A) y *Musa balbisiana* Colla ( $2n=2x=22$ , genoma B) son las principales para el desarrollo de diferentes variedades de consumo tanto de banano como plátano en programas de mejoramiento convencional (Figura 1). El genotipo *Musa acuminata* (haploide) es designado con la letra A, mientras que el genotipo de *Musa balbisiana* con la letra B. Normalmente el banano es el resultado (diploide o triploide) con mayor frecuencia de cruza entre *M. acuminata* y, en una frecuencia menor derivados de cruza entre cultivares *M. acuminata* y *M. balbisiana* (Figura 1) (OECD, 2009).

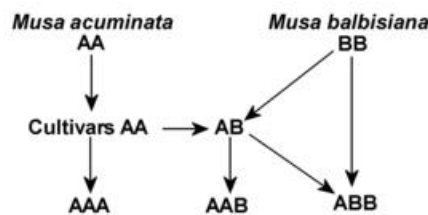


Figura 1: Relaciones de cruzamientos más comunes de Musaceae para el consumo

#### 2.1.2 Origen y Distribución

A pesar de que el origen exacto no está establecido, existe la teoría que este cultivo pudo iniciarse en Malasia, donde incluyen regiones de la Península Malay, Indonesia, Filipinas, Nueva Guinea, y a India como un segundo posible centro. La dispersión de este cultivo fuera de Asia, se lo relaciona directamente a los movimientos y distintos asentamientos del hombre (Daniells et al., 2001; (OGTR, 2008), generando las variedades que se consumen en la actualidad, las cuales son el resultado de cruza entre variedades silvestres y cultivadas e híbridos asociados a *M. acuminata* y *M. balbisiana*.

Dentro de Asia, India es considerada uno de los centros de generación de híbridos más importantes del mundo. Generando un resultado paralelo de evolución de las variedades disponibles para este cultivo. Con dichas cruza

realizadas entre diversos materiales genéticos se ha podido obtener variedades que poseen capacidades o características importantes como robustez, resistencia a enfermedades y a salinidad. Sin embargo, muchas de las variedades comestibles provienen de mutaciones espontáneas en plantas silvestres que fueron seleccionadas para cultivarse, domesticarse y multiplicarse vegetativamente (OGTR, 2008).

### **2.1.3 Mejoramiento del cultivo**

#### **2.1.3.1 Mejoramiento convencional**

El mejoramiento convencional es usado para la generación de cultivares de variedades comerciales que, posean características ideales existentes en variedades salvajes o en variedades cultivadas diploides (Kole, 2007). El principal problema es la obtención de cultivares tetra y triploides, los cuales son indispensables en la obtención de una producción con frutos partenocárpicos. La obtención de banano comercial triploide, puede realizarse mediante cruza entre diploides con la recombinación solo de parentales “masculinos”, o de tetraploides con la cruza de diploides donde ambos parentales se segregan (OGTR, 2008). Ambas cruza, tanto polinización artificial o libre, generan descendencia triploidea, una selección de acuerdo con la fertilidad puede incrementar la eficiencia en la fertilización. Pese a los múltiples conocimientos sobre el mejoramiento convencional, este deja de ser ideal debido al largo tiempo total (2 años al menos para ser completado) para obtener una variedad ideal, acompañado de los múltiples requisitos que incrementan los costos (OGTR, 2008).

#### **2.1.3.2 Mejoramiento por ingeniería genética**

##### **Mutación**

Existen programas de mejoramiento por mutación, llevada a cabo de dos maneras principales, i) irradiación gamma y, ii) variación somaclonal. A pesar de existir mutaciones químicas usando EMS (ethyl methyl sulphonate), las dos mencionadas son las más usadas. Por medio de irradiación gamma, se han obtenido variedades resistentes a ciertas enfermedades. Usando radiación gamma se han obtenido variedades de cultivares de ‘Gros Michel’ denominadas “Highgate” tolerantes a *Fusarium oxysporum* (OGTR, 2008). Mientras que por medio de variaciones somaclonales, a pesar de ser un problema para quienes realizan cultivo masivo *in vitro*, es usado como herramienta para la obtención de nuevas fuentes de germoplasma, desarrollando ciertas variaciones que generan resistencia a enfermedades, como la obtención de cruza entre Cavendish con variaciones somaclonales que les brindaron resistencia a *F. oxysporum* Raza tropical 4 (FocTR4) (OGTR, 2008).

## Modificaciones Genéticas Dirigidas

La obtención de embriones somáticos es un prerrequisito en la mayoría de los protocolos de transformación de plantas con la idea final de obtener un mayor número de plantas transformadas, y banano no es la excepción (Hansen & Wright, 1999). Para esto uno de los inconvenientes para la obtención de suspensiones embriogénicas, es la obtención de flores masculinas de los cultivares, que son frecuentemente usadas debido a que estos son los explantes para obtener células somáticas (OGTR, 2008). Usando herramientas modernas, es posible realizar transformación con regeneración mediante embriogénesis somática. Muchos de los protocolos de transformación en banano están vinculados al uso de *Agrobacterium tumefaciens* como mediador de la transformación (Sanchez Timm & Santos Ordoñez, 2010), el uso de bombardeo dirigido y electroporación (Becker, Dugdale, Smith, Harding, & Dale, 2000; Houllou-Kido et al., 2005). Los resultados de diversos trabajos mediante técnicas de ingeniería genética han obtenido líneas transgénicas con resistencia a diversas enfermedades, aunque la mayoría de esfuerzos están enmarcados en obtener líneas resistentes a *F. oxysporum f. sp. cubense* y *P. fijiensis* (OGTR, 2008).

### 2.1.4 Principales Enfermedades

#### 2.1.4.1 Causadas por Hongos

Existen diversas enfermedades causadas por hongos que atacan a los cultivos de banano, pero algunas pueden ser devastadoras. La Sigatoka Negra, ocasionada por el hongo ascomiceto *P. fijiensis*, actualmente reportada en todo el Pacífico, Asia, África y el Caribe puede ocasionar una pérdida aproximadamente del 30 al 50% de producción total del cultivo. El control de esta enfermedad puede aumentar en un ~27% los costos de producción y se ha determinado que los costos de control pueden incidir en el incremento de un 15-20% en el costo de la exportación del producto (OECD, 2009).

La enfermedad del Mal de Panamá es generada por el hongo *F. oxysporum f. sp. cubense* raza 4, el cual habita perennemente en el suelo. Esta enfermedad ha sido reportada en todos los sectores de cultivo de banano excepto Melanesia, algunos reportes indican un esparcimiento de esta enfermedad rápidamente por Asia y el Pacífico, representando un alto peligro para América, donde se encuentran concentrados los mayores productores de los grupos susceptibles a la enfermedad (Pocasangre, Ploetz, Molina, & Perez Vicente, 2011). Los grupos Cavendish (AAA), son las variedades más susceptibles, incluyendo “Valery”, “Gran enano” y “Williams”. A mediados del siglo 20, la Raza 1 de este hongo generó un declive de la variedad comercial “Gros Michel”, la cual era la más exportada en ese momento (OECD, 2009; R. Ploetz, 2000).

#### **2.1.4.2 Causadas por Bacterias**

La enfermedad del Moko, es una enfermedad vascular causada por una cepa de *Ralstonia solanacearum* (*Pseudomonas solanacearum*) y fue reportada inicialmente en Trinidad, en el Caribe, América Central y del Sur. Esta enfermedad causó un sinnúmero de pérdidas en plantaciones de banano, provocando el mayor impacto en los pequeños agricultores. Los grupos más susceptibles pertenecen a Cavendish (AAA) y algunos AAB (OECD, 2009). Asimismo, existe la enfermedad de la sangre del banano, causada por un complejo de especies de bacterias vasculares silvestres denominadas phylotypo IV (“raza 4”). Los síntomas presentados son similares al Moko con variaciones en los estadios de crecimiento de la planta y dirección de la infección (OECD, 2009).

#### **2.1.4.3 Causadas por Virus**

Banana bunchy top virus, es una de las enfermedades virales de mayor importancia, debido a la fácil dispersión, es causada por *bauvirus* (*Nanoviridae*) y transmitida por un áfido. Esta enfermedad es de origen nativo del sureste de Asia, y llevada a diversos países en el hemisferio oriental, incluyendo las islas del Pacífico. Esta enfermedad puede generar la pérdida total de las plantaciones, y se ha determinado que todos los grupos de banano son susceptibles a la misma (OECD, 2009).

### **2.2 Sigatoka Negra, *Pseudocercospora fijiensis***

#### **2.2.1 Origen y Distribución**

Esta enfermedad fue reportada por primera vez en el Valley de Fiji en 1963, se cree que la dispersión se produjo por el sureste de Asia y el sur del Pacífico. En Ecuador el primer reporte fue en el año 1987 en la provincia de Esmeraldas, para luego ser hallada en la provincia de Los Ríos, Guayas en 1989 y El Oro en 1992 (Rivas & Rosales, 2003). Esta enfermedad es causada por el hongo ascomiceto *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet). Este patógeno puede producir conidios y ascosporas, donde en ambos casos es altamente infeccioso. Se dispersa a través del viento y para el caso de conidios por medio de lluvias e irrigaciones. Pero debido a su cantidad en el medio y tamaño, las ascosporas son más importantes en la diseminación de la enfermedad entre plantaciones en comparación con los conidios (R. C. Ploetz, 2001).

#### **2.2.2 Control**

Estrategias químicas siguen siendo el principal método para el control de esta enfermedad. Mezclas basadas en sulfato y cobre llamadas “Bordeaux mixture” empezaron a ser muy usadas en los años 30s, reemplazando los fungicidas sistémicos, protectantes y tardíos con cocteles de múltiples fungicidas de base de petróleo han generado emulsiones superiores que controlan de manera exitosa

la enfermedad. Muchos fungicidas potentes de actividad sistémica siguen siendo usados hasta la actualidad, donde se incluyen inhibidores de la biosíntesis de esteroides (SBI, sterol biosynthesis inhibitors) como los inhibidores de dimetilación (DMIs, demethylation inhibitors) que fueron introducidos en los 80s y algunos inhibidores de quinonas externas (QoIs, quinone outside inhibitors) introducidos en la década de los 90s (FRAC, 2012; Kuck & Gisi, 2008; Russell, 2009).

Pero, pese al éxito de los controles, de acuerdo con la región y condiciones ambientales que pueden ser favorables para el patógeno puede presentar una mayor incidencia y a su vez mayor dispersión por lo que, los productores se han visto obligados a incrementar los ciclos de aplicación, incrementando la tolerancia de los patógenos. La resistencia a fungicidas según la FRAC (Fungicide resistance Action Committee), se refiere a una reducción heredable en la sensibilidad del patógeno hacia agentes antifúngicos (fungicidas) (FRAC, 2012). El control para *P. fijiensis* basado en benzimidazoles ha generado una gran resistencia de las cepas, por lo que la FRAC realiza recomendaciones de acuerdo a los grupos o clases de químicos un máximo número de aplicaciones (Brent & Hollomon, 2007).

### 2.3 *Biofertilizantes/Bioestimulantes*

Se determina como fertilizante a aquellas sustancias que son aplicadas de forma directa o indirecta a la planta y que ayudan en la nutrición de la misma, para mejorar así su crecimiento, calidad y producción (Finck, 1985). Los biofertilizantes muchas veces denominados también como bioestimulantes, cuando su acción es indirecta y esta es asociada a organismos vivos. Son conocidos como inoculantes microbiológicos, con la capacidad de nutrir el suelo donde se encuentran las plantas, de manera que exista un incremento de la productividad y fertilidad de la planta, debido a una mayor disponibilidad de nutrientes en el suelo. El uso de estos biofertilizantes puede brindar a la planta una serie de beneficios adicionales a la toma de nutrientes, tales como el incremento o activación de factores de crecimiento o de mecanismos de defensa contra ataques de patógenos (Ghosh, n.d.). El estudio de los biofertilizantes empezó en el año 1895, con el descubrimiento de *Rhizobium* (Nobbe & Hiltner, 1896), y se ha demostrado que el uso de mezclas específicas de biofertilizantes, favorece el crecimiento en la planta, debido al aumento de disponibilidad de macronutrientes en el suelo (Chavez, 2009).

Asimismo, los bioestimulantes, destinados a la agricultura, incluyen diversas sustancias y microorganismos que fomentan el crecimiento de la planta, con un mercado de aceptación creciente estimando en alrededor de los \$2.241 millones en ganancias para el 2018, con una tasa creciente anual del 12.5% (Calvo, Nelson, & Kloepper, 2014).

Se ha establecido cuatro tipos de biofertilizantes (ICAR Research Complex, 1999):

- i. Biofertilizantes fijadores de nitrógeno; compuestos principalmente por *Rhizobium*, *Azobacter*, *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*.
- ii. Biofertilizadores solubilizadores de fósforo (PSB, Phosphorus solubilizing biofertilizer); compuesto por *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*.
- iii. Biofertilizante movilizador de fosforo; compuesto por *Mycorrhiza*.
- iv. Biofertilizador promotor del crecimiento de la planta; compuesto básicamente por *Pseudonomas*.

### 2.3.1 Biol

La FAO, establece la importancia de generar abono orgánico, utilizando todos los residuos posibles provenientes de animales, vegetales y desechos de humanos; con un proceso primario de descomposición (FAO, 2002).

El biol, es un fertilizante biológico, cuya aplicación se da de manera foliar principalmente. Este fertilizante orgánico es elaborado en biodigestores o fermentadores, donde a través de una decantación el lodo viscoso que se forma es procesado para obtener una sustancia líquida concentrada de fácil aplicación (Jansen & Aparcana Robles, 2008).

Un estudio en el cual se realiza la obtención y evaluación del biofertilizante (biol), determina que éste tiene la capacidad de promover y fortalecer el crecimiento de la planta, sus raíces y frutos, esto debido a la producción de hormonas vegetales de crecimiento, de tal manera que se reduce la cantidad de aplicaciones de fertilizantes minerales y químicos (Jansen & Aparcana Robles, 2008).

Los análisis de suelos para plantaciones de banano con tratamientos de biofertilizantes denominados biol, que fueron elaborados en diferentes provincias en Ecuador (Guayas, El Oro y Los Ríos), mostraron altos índices de solutos, macro y micro nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, aunque el uso de este biofertilizante como control en campo para la enfermedad Sigatoka Negra, no produjo un cambio significativo para la mayoría de los tratamientos. Pese a estos resultados, análisis controlados para el crecimiento de este microorganismo en medio líquido tuvo una alta inhibición de crecimiento (Chavez, 2009). Hasta el momento, el análisis *in vitro* para evaluación del biol ha mostrado que existe inhibición en desarrollo de diversos patógenos en cultivos como el de *M. roleri* (Magdama, Maridueña, Villavicencio, & Peralta, 2011), el análisis en campo corrobora que existe una disminución en la infección de la enfermedad moniliasis en cultivos de cacao y mejoras de crecimiento de las plantas (Chavez, Leon, Ruiz, Averos, & Peralta, 2011).

### 2.4 Sistemas de defensa de las Plantas hacia Ataques bióticos

Pese a la gran diversidad de patógenos que pueden atacar a las plantas, existe un limitado número que alcanza una infección exitosa y finaliza colonizándolas, convirtiéndose en una enfermedad para ellas. Esta resistencia natural, puede deberse a tres razones principales, i) Las plantas en general no poseen un soporte nutritivo para ser considerado un nicho ideal para que los patógenos colonicen, lo

que las vuelve un hospedero no ideal; ii) Las plantas poseen barreras estructurales o componentes tóxicos, que inhabilita la infección de ciertos patógenos; y iii) las plantas poseen un reconocimiento especializado al ataque de patógenos, con mecanismos de defensa elaborados para una invasión localizada. Todos estos mecanismos dependen directamente de respuestas inducidas. Asumiendo así que, aquellas invasiones o enfermedades en plantas son dadas por falta de detección del patógeno por la planta por medio de una respuesta poco efectiva (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

#### **2.4.1 Respuesta hipersensitiva (HR)**

Se define así a la muerte celular programada del hospedero al poco tiempo de ser infectado por un patógeno (Agrios, 1988). Este proceso casusa la muerte del patógeno debido a la privación de nutrientes por parte del hospedero, aunque se ha determinado que ciertos patógenos pueden obtener nutrientes de las células muertas de las plantas (Osborn, 1996).

Este proceso ocurre debido a dos mecanismos internos principales: i) Un cambio en el metabolismo de la planta, incrementando rutas bioquímicas que producen radicales libres que son tóxicos para las células del hospedero y del patógeno, y; ii) un cambio genético dado al reconocimiento del patógeno que resulta en una muerte programada o apoptosis celular (Dangl, Dietrich, & Richberg, 1996; Mittler & Lam, 1996).

#### **2.4.2 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS; Reactive Oxygen Species)**

Generalmente es la primera respuesta a activarse para interacciones incompatibles, y puede dar inicio el mecanismo de defensa HR (Doke, 1983; Doke & Ohashi, 1988). Las plantas poseen mecanismos para producir  $O_2^-$  que involucra NADPH oxidasas (Groom et al., 1996; Segal & Abo, 1993). El anión superóxido ( $O_2^-$ ) generalmente se descompone rápidamente a una manera no-enzimática o superóxido dismutasa (SOD) que cataliza a peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), donde en la mayoría de las plantas se puede detectar una mayor acumulación de este en respuesta a estrés (Sutherland, 1991)(Levine, Tenhaken, Dixon, & Lamb, 1994; Mehdy, 1994; Nürnberger et al., 1994). A pesar de que el daño ocasionado por  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , no son de acción rápida, este se vuelve letal a nivel celular cuando se convierten en especies más reactivas. Como en condiciones de formación de  $O_2^-$  bajo la presencia de  $HO_2$  resulta en un daño de membrana celular, lo que genera señales de lípidos de peróxidos. Mientras que  $H_2O_2$ , en presencia de  $Fe_2^+$  puede someterse a una reacción de fenton que desencadena en radicales libres altamente destructivos como OH, iniciando un autoprocesamiento de peroxidación lipídica (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

#### **2.4.3 Fortificación de la Pared Celular**

Las plantas dificultan el ingreso o penetración de los patógenos mediante su pared celular, aunque el ingreso puede verse dado por una herida o apertura de la célula. La pared celular puede conferir resistencia a la planta mediante

diferentes formas: i) Extracelular; ii) reduciendo el acceso a nutrientes (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

#### **2.4.4 Ácidos Benzoicos (BA) y Salicílicos (SA)**

La acumulación de BA y SA, generalmente se asocian a ataques de bacterias, hongos o virus, donde los altos niveles de acumulación se forman en lugares específicos del hospedero cercanos a la infección (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

#### **2.4.5 Proteínas de Relacionadas a Patógenos (PR) y otras Proteínas Relacionadas a defensa**

El termino PR, es denominado a proteínas intra o extracelulares que se acumulan en las células del hospedador luego de sufrir un ataque de patógeno o elicitor (Bowles, 1990). Estas han mostrado jugar un rol importante en la respuesta de las plantas, evidenciando actividades antifúngicas y antibacterianas en ensayos *in vitro* (Collinge et al., 1993; Melchers et al., 1994).

#### **2.4.6 Superfamilia de proteína de receptor de quinasa (receptor-like protein kinases; RLKs)**

Estas familias son clasificadas de acuerdo con el *motif* de repetición que poseen. Una de las clases más estudiadas son las que poseen repeticiones ricas en leucina (*LRR*; Leu-Rich repeat), asociada a la interacción proteína-proteína como señales intracelulares relacionadas a respuestas de estrés biótico (Walker, 1994).

#### **2.4.7 Lipooxigenasas (LOX)**

Los niveles de ARNm y proteínas LOX de actividad enzimática, tanto como la acumulación rápida de esta en la célula, están asociadas a genes de resistencia en plantas a patógenos (*R-Avr*) (Slusarenko, 1996). El incremento de la actividad enzimática de LOX contribuye a la resistencia de diversas maneras: i) activando rutas moleculares, como la del ácido jasmónico (JA), methyl-JA, o peróxidos lipídicos que activan rutas específicas de respuesta a ataques de patógenos; ii) causando un daño irreversible de la membrana, causando una muerte celular en el hospedero (Kepler & Novacky, 1985) iii) catalizando reacciones que producen tóxicos volátiles y no volátiles derivados de ácidos grasos (Croft, Juttner, & Slusarenko, 1993).

#### **2.4.8 Fitolexinas**

Son compuestos antimicrobianos de fácil acumulación, producidos en las cercanías de las zonas de ataque del patógeno, estrés o elicitores (Smith, 1996). La biosíntesis ocurre como una señal para la activación de una ruta secundaria, dando como resultado una inducción de la enzima PAL (Dixon & Paiva, 1995).



## **CAPÍTULO III**

### **3 . M e t o d o l o g í a**

#### **3.1 Fertilización de plantas de banano e infección con *P. fijiensis***

##### **3.1.9 Ensayo 1: Aplicación de biofertilizante Biol en hojas de Banano**

Para el ensayo 1, se usó un total de 54 plantas de banano variedad ‘Williams’ grupo genómico AAA, en fase 2 (plantas colocadas en invernadero con al menos 4 hojas desarrolladas), adquiridas directamente al ente comercial “Agripac”. El material seleccionado fue colocado en invernadero, se realizó un cambio de fundas y sustrato para incrementar espacio para un mejor desarrollo radicular y estas fueron mantenidas en invernadero, por un periodo de tres semanas. Se realizaron dos tratamientos (con aplicación y sin aplicación de biol) con tres replicas biológicas cada uno para los cuatro tiempos definidos, bajo condiciones controladas en invernadero: i) aplicación de Biol al 30% en hoja dos y tres (descripción de numeración de hoja en Anexo 2 de cada una de las plantas a ser tratadas en el ensayo), y ii) aplicación de agua estéril como control (*mock*) en las hojas dos y tres de cada planta. Se tomó tejido vegetativo (hoja 2 y 3, de acuerdo con la descripción gráfica en Anexo 1) de plantas para el ensayo Biol-Banano a las 0, 6, 24, 48 horas y 1 semana después de la aplicación del tratamiento de biol. Este bioensayo se realizó independientemente de los ensayos a continuación descritos.

##### **3.1.10 Ensayo 2: Aplicación de biofertilizante Biol directo a sustrato de plantas Banano previamente infectados con *Pseudocercospora fijiensis***

En este ensayo, se usó un total de 48 plantas de banano variedad “Williams” (AAA) en fase 2, para el tratamiento con biol, adquiridas de SEBIOCA-ESPOL. Adicional, 24 plantas de bananos adquiridos de la misma manera para control. El material seleccionado fue colocado en invernadero, siguiendo el proceso descrito anteriormente, para la aclimatación preliminar al desarrollo de los bioensayos.

Previo a la fertilización con biol, siete días antes se realizaron infecciones a las plantas con *P. fijiensis* (20,000 conidios/ml) por aspersión en las hojas 2, 3 y, cigarro (descripción de numeración de hoja en Anexo 2) de acuerdo con Jiménez *et al.* (2007), para plantas sometidas a tratamiento con biol, como aquellas denominadas control.

El tratamiento con biol consistió de 6 réplicas aleatorias de plantas con aplicación directa de BIOL al 30% al sustrato de las plantas de banano cada 15 días. El control para este bioensayo fue realizado sin aplicación de biol (*mock*, este control fue usado para ensayo 2 y 3 los cuales fueron realizados en el mismo tiempo). Se realizaron mediciones del índice de infección cada 15 días luego de la inoculación.

### 3.1.11 *Ensayo 3: Aplicación de biofertilizante Biol en hojas de Banano previamente infectadas con Pseudocercospora fijiensis*

En este ensayo se realizó en conjunto con el ensayo 2, usando un total de 48 plantas de banano variedad ‘Williams’ (AAA) en fase 2, adquiridas de la misma manera que el ensayo anterior y estas fueron sometidas a las mismas condiciones por tres semanas para la aclimatación de las mismas para los bioensayos. Los controles usados para estos análisis fueron los mismos que el ensayo anterior.

La realizaron infecciones a las plantas con *P. fijiensis* (20,000 conidios/ml) por aspersión en las hojas 2, 3 y cigarro (descripción de numeración de hoja en Anexo 2) de acuerdo a Jiménez *et al.* (2007), luego de la infección se mantuvieron en cajas de 1\*1 metro aisladas entre los tratamientos.

El tratamiento constó de 6 réplicas aleatorias de plantas aplicando BIOL al 30% en las hojas 2 y 3 cada 15 días por medio de aspersión.

### 3.2 *Condiciones del Biofertilizante*

Ensayo 1, Aplicación de biofertilizante Biol en hojas de Banano:

El Biol fue obtenido dentro de un biodigestor generado en el departamento de técnicas agrícolas del centro bajo las siguientes características: temperatura de 25°C, pH 4.5, velocidad de agitación de 75rpm, el tiempo de digestión fue de 7 días con una capacidad total de 2L (información obtenida de manera directa del personal).

Ensayo 2 y 3, Aplicación de biofertilizante Biol en hojas o en sustrato de plantas de Banano previamente infectadas con *Pseudocercospora fijiensis*:

El biol fue producido en el CIBE, en el departamento de Técnicas Agrícolas, bajo las condiciones establecidas dentro del laboratorio, obteniendo un producto con las siguientes características: pH en rango de 3.81-4.17, conductividad de 20.23-24.47 mS/lcm, solutos de 5.69-7.81g/L, densidad de 1.03-1.04 g.cm<sup>3</sup>, materia orgánica de 1.89-4.91%, salinidad de 8.95-10.59ppm a una temperatura de 26.6°C. Durante la recolección de muestras de biol para realizar las aplicaciones en invernadero, las condiciones fueron las siguientes: pH a 3.82, conductividad de 21.33ms/lcm, solutos 7.78gr/L, salinidad de 10.35ppm (información obtenida de manera directa del personal).

### 3.3 *Condiciones de crecimiento del hongo Pseudocercospora fijiensis*

Los conidios de *P. fijiensis* usados para la infección, fueron aislados de cepas existentes en el laboratorio de Biología Molecular del CIBE–ESPOL. Se realizó un subcultivo de *P. fijiensis* en cajas Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, por siete días en condiciones de luz y temperatura ambiente, luego de este tiempo el micelio fue separado del medio y triturado manualmente, el producto de esta trituración fue subcultivado en un medio modificado V8 (Atlas, 2005), en el cual se mantuvo por siete días bajo condiciones de luz y temperatura ambiente. Los conidios obtenidos

después de este periodo fueron disueltos en agua Tween™ 20 (0.005%) y contabilizados con ayuda de una cámara de Neubauer. Una vez obtenidos los conidios (20,000 conidios/ml) se inocularon las plantas con ayuda de un aerógrafo Badger 100, manteniendo cada tratamiento por separado en cajas de aluminio forradas con plástico transparente.

### 3.4 Determinación del Índice de Severidad

Este índice fue determinado usando la escala del índice de severidad (Tabla 1), de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 2 (Stover, 1980), para evaluar el área foliar afectada por la enfermedad de Sigatoka Negra en los distintos tratamientos. Los análisis estadísticos se realizaron usando el software libre Excel y RStudio (RStudio Team, 2016)

Tabla 1: escala de índice de severidad basada en Gaulh y modificada por Stover.

Escala	Descripción
0	Sin Síntomas
1	No Más Del 1%, (Estado 1,2 y 3)
2	Menos Del 5% De Hoja Afectada
3	De 6% Al 15% De Hoja Afectada
4	Del 16% Al 33% De Hoja Afectada
5	Del 34% Al 50% De Hoja Afectada
6	Más Del 50% De Hoja Afectada

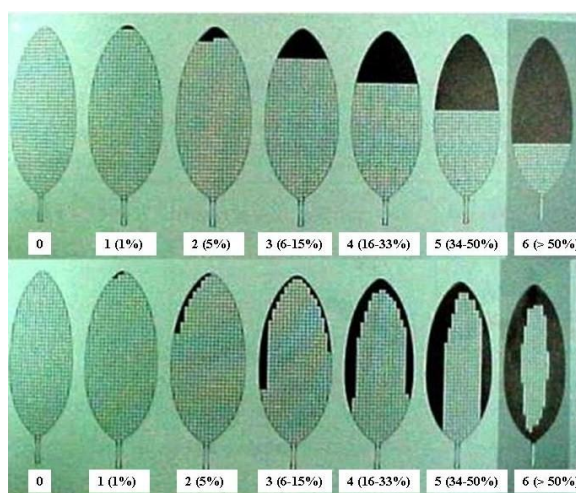


Figura 2: Representación esquemática de la escala de Gaulh's modificada por Stover usada para la evaluación de Sigatoka Negra

### 3.5 *Parámetros fisiológicos*

El índice de estabilidad de la membrana (MSI; por sus siglas en inglés, Membrane stability index), se realizó mediante el protocolo ya establecido por Sairam *et al.* (1997), donde se tomó un fragmento de aproximadamente 2x2cm de la hoja dos y tres, luego se colocó en agua des-ionizada. La conductividad necesaria para los diferentes ensayos fue tomada en los tiempos determinados usando el equipo conductivity meter 441 (Corning, 109122-1 Rev. A, 10/96).

El contenido de clorofila fue tomado para el ensayo de biol-planta y se realizó a las 0, 6, 24, 48 horas y una semana luego de la aplicación de biol de manera foliar, antes de realizar el corte en las hojas dos y tres. Para el ensayo de Biol-Planta-*P. fijiensis*, se realizaron mediciones de clorofila a las 0 horas de aplicación de biol, 0 horas después de infección (PI) de *P. fijiensis*, 7, 15, 30, 45, 60, 75 DPI. Este parámetro fue tomado con el equipo Chlorophyll meter Konica Minolta SPAD 502. Análisis estadísticos de los datos fisiológicos fueron realizados usando los softwares libres Excel y Rstudio (RStudio Team, 2016).

### 3.6 *Extracción de ARN*

La extracción se realizó mediante dos protocolos, el primero en base a fenol-cloroformo-isoamil alcohol, protocolo interno del laboratorio de biología molecular del CIBE. En breve, se usó fenol-cloroformo-isoamil alcohol (phenol-chloroform-IA 24:24:1; Sigma Aldrich, USA), iniciando con un buffer para lisis celular, que contenía NaCl (400 Mm), tris HCl (10 Mm, pH8), EDTA (2 mM, pH8), 2% de Polyvinylpyrrolidone (PVP, 36.000 MW) y 7µl de 2-β-mercaptoethanol. Se procedió con precipitaciones continuas usando fenol-cloroformo-IA (25:24:1) mix (Sigma Aldrich, USA), se precipitó el ARN usando acetato de sodio (3M) y se dejó incubar toda la noche a -80°C, para terminar con la extracción, se realizaron dos lavados seguidos usando etanol al 70%. El pellet se resuspendió en 50µl de agua estéril tratada con Diethyl pyrocarbonate (DEPC). El ARN fue guardado en el congelador a -80°C hasta el momento de realizar los análisis respectivos. El segundo protocolo usado fue mediante kit comercial Spectrum™ Plant Total RNA Kit, SIGMA, siguiendo las indicaciones del proveedor.

### 3.7 *Síntesis de ADNc*

El ADNc necesario para la generación de las librerías genéticas, se sintetizó a partir de diferentes *pools* de muestras: *pool* 1; plantas de banano con aplicación de biol (*tester* 1), *pool* 2; plantas de banano sin aplicación de biol y con aplicación de agua (*driver* 1), *pool* 3; plantas de banano previamente infectadas con *P. fijiensis* con aplicaciones repetidas de biol al sustrato (*tester* 2), *pool* 4; plantas de banano previamente infectadas con *P. fijiensis* con aplicación repetidas de manera foliar de biol (*tester* 3), *pool* 5; plantas de banano con infección de *P. fijiensis* (*driver* 2). De cada uno de estos *pools* se realizó de manera independientemente la síntesis de ADNc, partiendo de una concentración de 20ug de ARN total, usando el kit

SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

De manera individual cada una de las muestras fue tratada con ADNasas usando el kit RQ1 RNA-Free DNase (Promega, cat. # M6101), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una cantidad final de 1µg de ARN total.

Las síntesis de ADNc para cada muestra, fue realizada usando el kit Super script III First-Strand Synthesis Super mix for qPCR (Invitrogen, USA) con un volumen final de 20ul, iniciando con 1ug de ARN previamente tratado con ADNasas.

### 3.8 Generación de Librería Genética

Las librerías fueron realizadas mediante la técnica de hibridación por supresión sustractiva (SSH) usando el kit PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech Laboratories, Inc., USA) y se siguieron las especificaciones del proveedor a excepción de la síntesis de ADNc, explicada previamente.

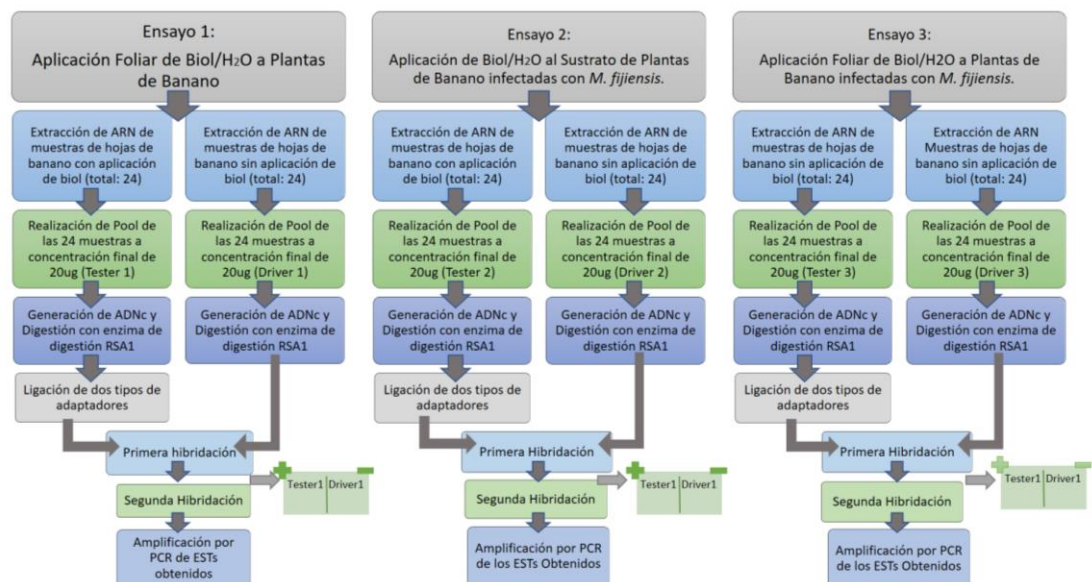


Figura 3: Esquema de la Generación de librerías genéticas mediante técnica SSH para los distintos ensayos realizados.

### 3.9 Clonación y Obtención de Expressed sequence tags (EST)

Una vez obtenidos los ESTs totales (solo aquellas que superaban los 500pb al realizar PCR punto final como los primers M13), estos fueron clonados en el vector de transporte pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA) y luego transferidos dentro de la bacteria *Escherichia coli* cepa DHα5, para así obtener la concentración requerida de fragmentos para la secuenciación.

Los plásmidos fueron extraídos mediante dos metodologías: i) método alcalino, usando de 3-5ml de la bacteria en crecimiento resuspendido en medio líquido LB de acuerdo a las siguientes indicaciones: 10g Bacto-tryptona, 5g extracto de

levadura, 10g NaCl, se ajusta el pH a 7.5 usando NaOH y se ajusta finalmente el volumen a 1L usando dH<sub>2</sub>O con sus respectivos antibióticos (kanamicina a 20ug/ml). Luego, se realizó una centrifugación a máxima velocidad por 10 minutos y se resuspendió el residual bacteriano en una solución que contiene: glucosa 50mM, tris-HCl a 25mM en pH8, EDTA a 10mM y RNaseA, incubándose en hielo por 5 minutos. Se agregó una segunda solución que contenía NaOH (0.2N) con SDS (1%) y se procedió a mezclar invirtiendo el tubo; para luego colocar la muestra nuevamente en hielo por un lapso de 5 minutos. Una tercera solución, que contenía potasio (K; 3M) y acetato de amonio 5M a pH 5.5 fue agregada a la muestra, y posteriormente se mantuvo en hielo por 5 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 13.000 RPM por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante en tubos limpios y se agregó isopropanol en una ratio de 1:1. Las muestras fueron centrifugadas a 13.000 RPM por 10 minutos, se lavó el pellet con etanol frío al 70% y se resuspendió en TE (pH 8.0). ii) Segundo protocolo para extracción de plásmidos se realizó usando el kit Purelink HQ Mini Plasmid DNA Purification Kit, de Invitrogen, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **3.10 Secuenciación de ESTs aislados**

Se realizó la secuenciación enviando placas de 96 pocillos, con los plásmidos aislados que contenían los ESTs seleccionados a ser analizados, a la compañía Macrogen (<http://foreign.macrogen.com/eng/>). Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron analizadas usando el banco de información “National Center for biotechnology Information” (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), realizando tanto BLASTn como BLASTx, identificando posibles ESTs reportados. Para luego ser analizados en el programa Blast2go, con la finalidad de determinar los sistemas biológicos de los ESTs anotados (REFB2G).

### **3.11 Diseño de Primers**

Para el ensayo 1 se diseñaron primers para un total de 13 genes a ser analizados. Los primers fueron diseñados a partir de las secuencias de ESTs obtenidas en las librerías realizadas para cada uno de los ensayos, usando la plataforma libre, primers3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Anexo 4).

### **3.12 Generación y análisis de qPCR**

El análisis de expresión mediante qPCR fue realizado para cada muestra en cada tratamiento desarrollado (un total de 15 ADNc), usando Gotaq qPCR Master Mix (Promega. REF: A6002). Para la normalización de la expresión, en todas las muestras se usó el gen constitutivo Factor de Elongación (EF1-F2: CGGAGCGTGAAAGAGGAAT, EF1-R2: ACCAGCTTCAAACCACAG) el cual fue usado como una referencia para realizar la estandarización mediante el método  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra}) - \Delta Ct (\text{Housekeeping gene})$  (Livak y Schmittgen, 2001). Usando un total de 9 sets de primers (Anexo 2) para la cuantificación de expresión, todos los análisis estadísticos fueron realizados usando los softwares libres Excel y RStudio (RStudio Team, 2016).

## **CAPÍTULO IV**



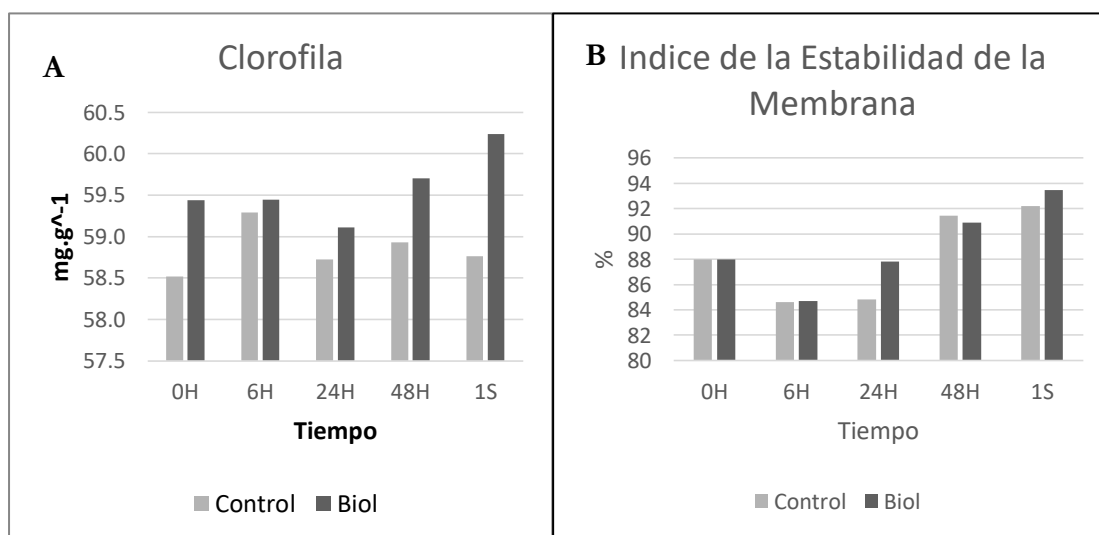
## 4. Resultados y Discusión

### 3.13 Análisis Fisiológicos

#### 4.1.1 Ensayo 1, Aplicación de biofertilizante biol en hojas de banano:

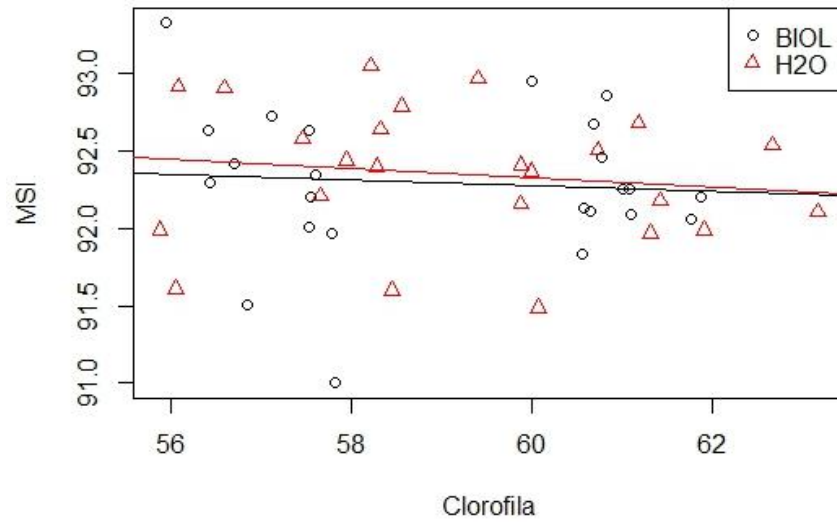
El biofertilizante biol incrementó los niveles de contenido clorofila a partir de las 48 horas de aplicación, los controles que no poseían aplicación de biol sin embargo tuvieron un cambio de contenido de clorofila no significativo (Figura 4A). Pese a la variación de cantidad de clorofila, ésta no representó una diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0.7925$ ) entre los tratamientos. Se ha determinado a través de diferentes ensayos que, la aplicación de bioestimulantes o biofertilizantes estimula el crecimiento de las plantas especialmente para aquellos que contenían mayor concentración de microorganismos en un determinado tiempo (Wu, Cao, Li, Cheung, & Wong, 2005). El incremento del vigor de la planta bajo el uso de estos bioestimulantes, está asociado a la facilitación de toma de nutrientes en el suelo, que incrementa la disponibilidad de los mismos para la planta. Tratamientos extensivos podrían contribuir a la visibilidad de esta asociación y demostrar mejores resultados para interacción del biol con las plantas (Rajasekaran et al., 2015).

De manera similar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0.9197$ ) de los promedios del índice de estabilidad de la membrana (MSI) entre ambos tratamientos aplicados, cuyos promedios de todo el ensayo fueron 92.29% para el tratamiento con biol y 92.36% para el control. (Figura 4B), con un cambio a las 24 horas de aplicación de biol con respecto al control.



**Figura 4: Contenido de Clorofila y Porcentaje de Estabilidad de la membrana para el ensayo 1.** A. Contenido de clorofila en plantas con aplicación foliar de biol y plantas control (H<sub>2</sub>O). B. Porcentaje de Estabilidad de la membrana para las plantas con aplicación foliar de biol y plantas control (H<sub>2</sub>O).

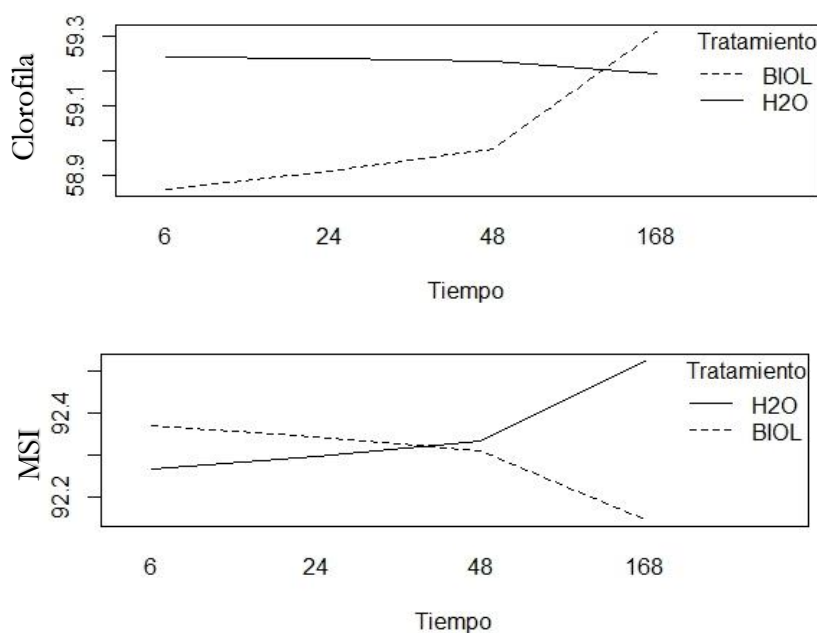
En los análisis realizados para determinar si la estabilidad de la membrana (Membrane Stability Index, MSI) posee una relación con el contenido de clorofila de acuerdo a los tratamientos establecidos, se encontró que no existe evidencia estadísticamente significativa ( $p= 0.711$ , para control y  $p=0.866$  para tratamiento) en plantas tratadas con biol, para poder establecer una relación directa entre ambos parámetros fisiológicos, tanto en las plantas tratadas con biol como en las plantas control (Figura 5).



**Figura 5: Análisis de Correlación entre la estabilidad de la Membrana y el Contenido de Clorofila para el ensayo 1.** BIOL representa al tratamiento en el que se efectuó la aplicación de manera foliar a la planta. H2O representa el tratamiento (control) en el cual se aplicó agua destilada a la hoja de la planta. La línea roja representa la correlación no significativa ( $p= 0.711$ ) del tratamiento control (aplicación de agua destilada estéril). La línea negra representa la correlación no significativa ( $p=0.866$ ) del tratamiento con Biol.

A pesar de no encontrar diferencias en los contenidos de clorofila entre tratamientos, si se considera la probabilidad estadística de la población total usando la muestra del ensayo en el tiempo de ensayo, observamos que, a las 48 horas después de la aplicación del biofertilizante las plantas incrementarían el contenido de clorofila, lo que puede estar altamente relacionado a la forma de aplicación que se realiza (para este estudio fue de manera foliar), ya que las plantas obtienen energía solar a través de las hojas y el biol puede interferir en la captación exitosa de luz. Mientras que, al realizar el mismo análisis sobre el porcentaje del índice de estabilidad de la membrana este decrece a partir de la hora 48, para las plantas a las que se le realizó aplicación de biol (Figura 6). Estudios en sembríos de arroz demuestran que el uso de biofertilizantes en conjunto con fertilizantes de N y P incrementa la producción de arroz como el vigor de la planta, sin provocar el deterioro del suelo en aplicaciones a largo plazo (Rajasekaran et al., 2015).

Se reportaron en diversos estudios que el uso de ciertos biofertilizantes en la fase vegetativa estimula el crecimiento de las plantas y tiene influencia en la producción del fruto para el caso de estudio de tomate, donde se vio un aumento en el desarrollo de hojas y de raíces (Dinu, Dumitru, & Soare, 2015).

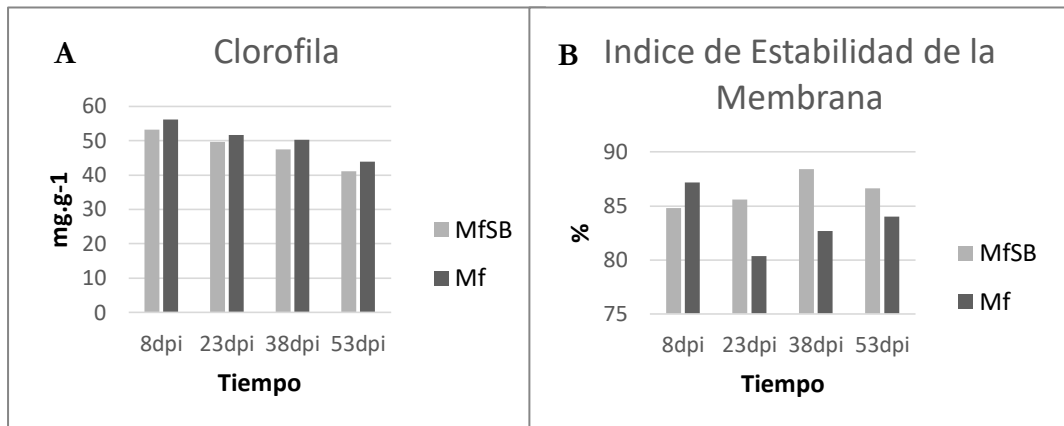


**Figura 6: Probabilidad de Evolución en el tiempo para el ensayo 1** del contenido de Clorofila (arriba) y de MSI (abajo) para los tratamientos con biol (línea punteada) y control (línea continua).

#### 4.1.2 *Ensayo 2, Aplicación de biofertilizante biol en sustrato de plantas de banano infectadas con P. fijiensis*

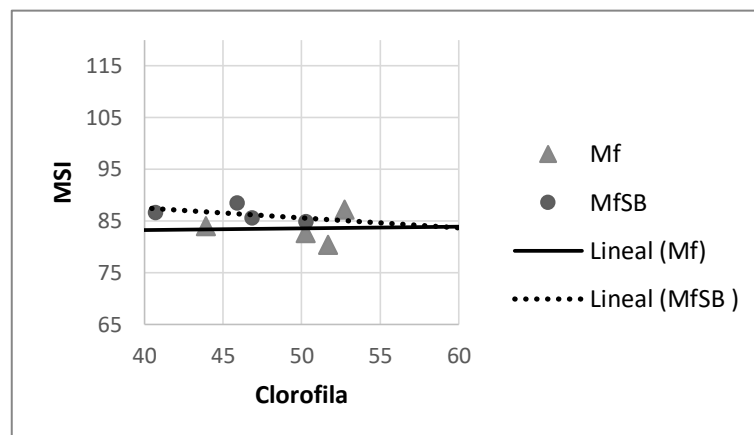
Pese a que el contenido de clorofila dentro del ensayo 2 no presentó una abrupta diferencia con el control, durante el tiempo de estudio, el tratamiento biol mostró un decrecimiento significativo ( $p= 0.0198$ ) al cumplir el tiempo de este ensayo (Figura 7-A), con promedio para el tratamiento con biol de 45.9 mg/g y para el control de 49.6mg/g.

La Sigatoka Negra, genera daño a nivel foliar, que en algunos casos causa una destrucción mayor al 50% del área de la hoja, produciendo un impacto negativo en los niveles de fotosíntesis y producción de clorofila a nivel celular (R. C. Ploetz, 2001), por este motivo, el decrecimiento de la concentración de clorofila en el ensayo puede estar asociado a la colonización del microorganismo en la planta.



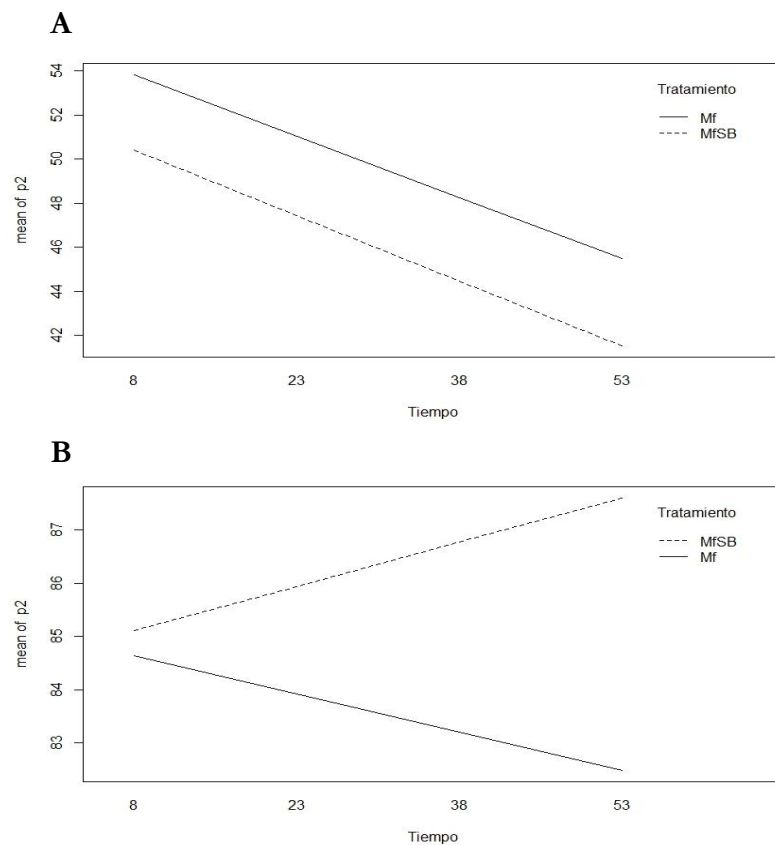
**Figura 7: Contenido de Clorofila y Porcentaje de Estabilidad de la Membrana para el ensayo 2.** A. Contenido promedio de la clorofila para las plantas con aplicación en el sustrato de biol e inoculadas con *P. fijiensis* y plantas control (H<sub>2</sub>O) e inoculadas con *P. fijiensis*.

Mientras que, el porcentaje de MSI se mantuvo estable para el tratamiento con biol (SfSB) mostrando una diferencia entre los tratamientos (plantas inoculadas con *P. fijiensis* sin biol) con una diferencia altamente significativa ( $p= 5.39e^{-06}$ ) (Figura 7-B), si realizamos un análisis en el tiempo la variación en el porcentaje de MSI, no muestra sin embargo, una diferencia significativa ( $p= 0.386$ ), donde los promedios de dicho porcentaje fueron para los tratamiento MfSB (aplicación biol) y Mf (control) de 86.3% y 83.5% respectivamente.



**Figura 8: Análisis de Correlación entre la estabilidad de la Membrana y el Contenido de Clorofila para el ensayo 2.** MfSB representa al tratamiento en el que se efectuó la aplicación de manera directa al sustrato de plantas previamente inoculadas con *P. fijiensis*. Mf representa el tratamiento en el cual se aplicó agua destilada al sustrato de plantas previamente inoculadas con *P. fijiensis*. La línea punteada representa la correlación no significativa ( $p\text{-value} = 0.8364$ ) del tratamiento con biol a plantas inoculadas. La línea negra representa la correlación no significativa ( $p\text{-value} = 0.7691$ ) del tratamiento sin Biol de plantas inoculadas.

Se realizaron análisis para demostrar si existe relación entre la estabilidad de la membrana y el contenido de clorofila de acuerdo con los tratamientos establecidos, donde se encontró que para este ensayo con aplicación directa al sustrato de biol, existió una correlación negativa fuerte ( $Cor = -0.03059865$ ) por lo que se puede determinar que estos dos parámetros fisiológicos estén vinculados mutuamente en el proceso de interacción con biofertilizante-planta-patógeno de manera negativa (Figura 8).



**Figura 9: Probabilidad de Evolución en el tiempo para el ensayo 2 del contenido de Clorofila (A) y de MSI (B) para los tratamientos con biol en sustrato (línea punteada) y control (línea continua).**

Este ensayo muestra que a lo largo del ensayo el contenido de clorofila para los dos tratamientos mantiene una sintonía, donde si se considera una población total para el tiempo máximo evaluado (53 días) resulta que los dos tratamientos decrecen su contenido de clorofila al transcurrir este tiempo. Mientras que, por otro lado, si comparamos estos resultados con el análisis de probabilidad de la población en base a la muestra en el tiempo estudiado, notamos que, a diferencia del control, la aplicación de biol directamente al sustrato incrementa el porcentaje de estabilidad de la membrana en este estudio (Figura 9). Si tomamos

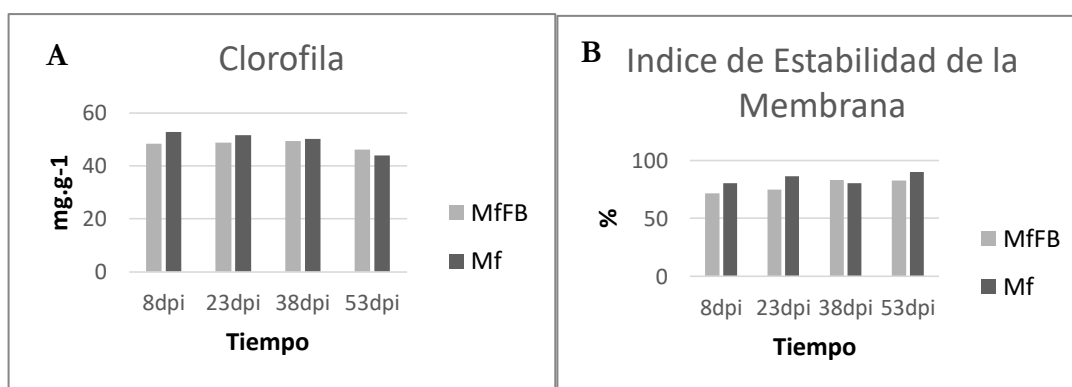
en cuenta los estudios realizados en otros ensayos de aplicación de biol en suelo de cultivos, los análisis al sustrato demuestran acumulaciones mayores de nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas (Chavez, et al 2009), por lo que este podría ser un comportamiento similar al encontrado en dichos ensayos.

Tratamientos de inmersión directa de raíces de tomate con biocontroles de cepas de *Pseudomonas* no solo demuestran que existe una disminución de la infección de patógenos de desarrollo temprano, sino que el crecimiento de la planta puede mantener un desarrollo mayor en comparación con plantas no tratadas (Abiodun, Osaretin, Elizabeth, Benson, & Ajibola, 2017).

#### 4.1.3 Ensayo 3, Aplicación foliar de biol en plantas de banano previamente inoculadas con *P. fijiensis*

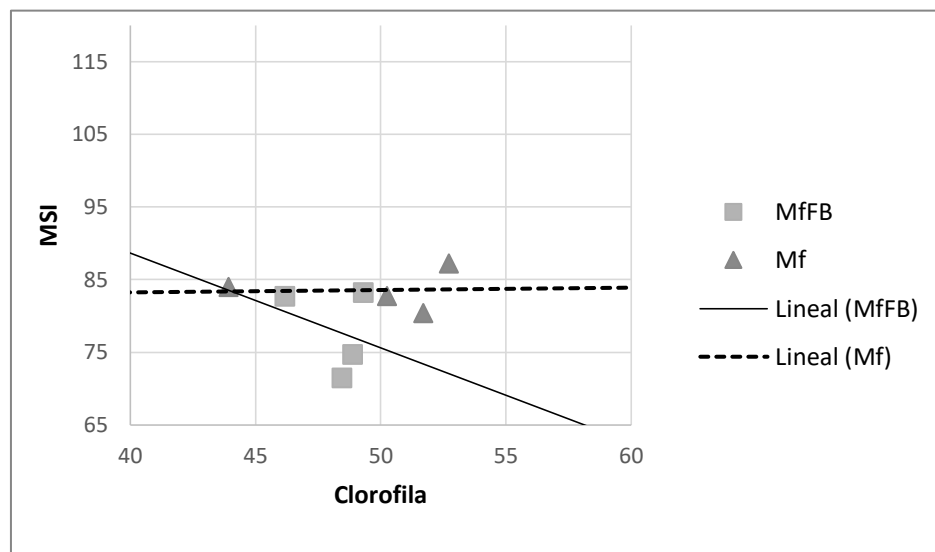
En este ensayo, la concentración de clorofila tuvo una fluctuación con respecto a su contenido en la comparación del tratamiento de aplicación foliar de biol y el control, donde se presenta un decrecimiento, aunque no presenta una diferencia significativa ( $p$ -value: 0.0752) entre los tratamientos. Lo que sugiere que el tratamiento de aplicación de biol de manera foliar puede presentar una diferencia significativa en el tiempo, esta variación está reflejada en el día 53 a diferencia del control que se mantuvo decreciendo desde el inicio de la aplicación (Figura 10-A), donde los promedios para el tratamiento de biol y control fueron de 48.2mg/g y 49.6 mg/g respectivamente.

Para los análisis del MSI dentro de este ensayo, se presenta una diferencia significativa ( $p$ -value=0.0229) del tratamiento con biol en el tiempo. Pese a que en este ensayo los dos tratamientos poseen un incremento en el porcentaje de MSI, la diferencia entre los tratamientos en el tiempo es significativa ( $p$ -value: 0.03045) (Figura 10-B).



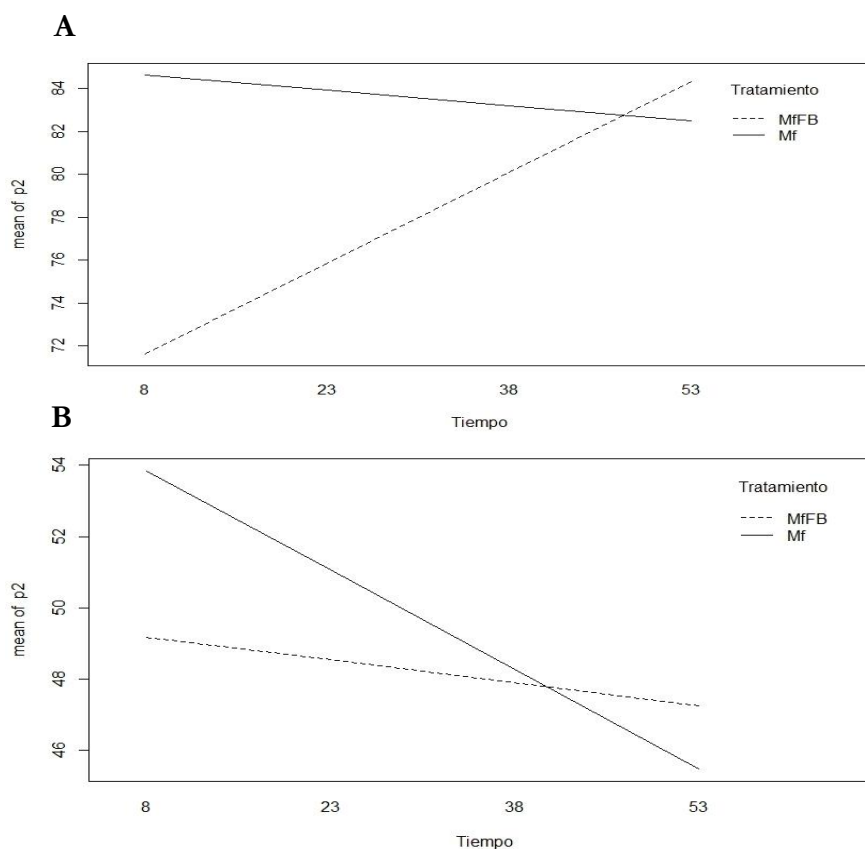
**Figura 10: Contenido de Clorofila y Porcentaje de Estabilidad de la Membrana para el ensayo 3.** A. Representa en contenido promedio de la clorofila para las plantas con aplicación foliar de biol e inoculadas con *P. fijiensis* y plantas control (H<sub>2</sub>O) e inoculadas con *P. fijiensis*. B. Representa el porcentaje promedio de la Estabilidad de la membrana para las plantas con aplicación foliar de biol y plantas control (H<sub>2</sub>O) inoculadas con *P. fijiensis*

Por lo que, para determinar si en este ensayo la reducción del contenido de clorofila con el aumento del porcentaje de MSI están relacionados, se realizó un análisis de correlación, el cual dio un valor de -0.91, lo que indica una relación fuerte de manera negativa para el tratamiento de aplicación foliar de biol y de -0.04 para el tratamiento control, estableciendo que estos dos parámetros fisiológicos de respuesta de la planta no se encuentran influenciados estadísticamente entre ellos en el tratamiento sin inoculación de biol (Figura 11).



**Figura 11: Análisis de Correlación entre la estabilidad de la Membrana y el Contenido de Clorofila para el ensayo 3.** MfFB representa al tratamiento en el que se efectuó la aplicación de manera foliar a plantas previamente inoculadas con *P. fijiensis*. Mf representa el tratamiento en el cual se aplicó agua destilada de manera foliar a plantas previamente inoculadas con *P. fijiensis*. La línea continua representa la correlación significativa ( $p\text{-value} = 0.08364$ ) del tratamiento con biol a plantas inoculadas. La línea punteada representa la correlación no significativa ( $p\text{-value} = 0.7691$ ) del tratamiento control de plantas inoculadas

Si se realiza un análisis de probabilidad poblacional en el tiempo estudiado (53 días) para cada tratamiento, se determina que el contenido de clorofila para el tratamiento con aplicación foliar de biol a plantas infectadas con *P. fijiensis*, tiende a incrementarse con respecto al tiempo, a diferencia del tratamiento control que presentaría un decremento paulatino (Figura 12). Por el contrario, si realizamos este análisis en el porcentaje de MSI, notamos que se establece un decrecimiento de este porcentaje para los dos tratamientos, pese a que el tratamiento con aplicación foliar de biol es menos abrupto.



**Figura 12: Probabilidad de Evolución en el tiempo para el ensayo 3 del contenido de Clorofila (A) y de MSI (B) para los tratamientos con biol en aplicación foliar (línea punteada) y control (línea continua).**

#### 4.2 Análisis del Índice de Severidad

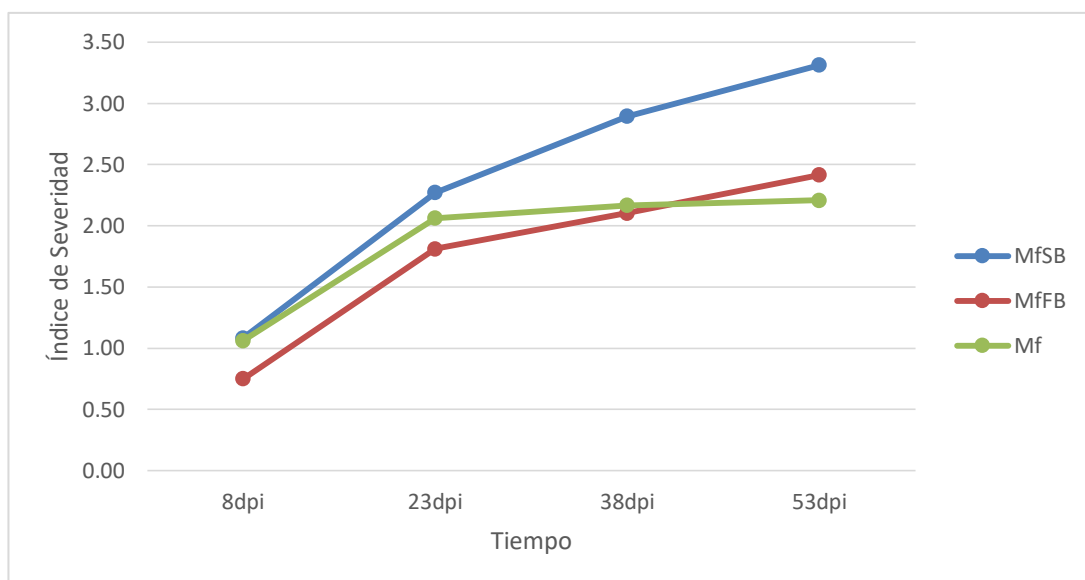
En el análisis de los ensayos del biol como control de patógenos, se determinó que durante el inicio de infección del patógeno en el ensayo de aplicación foliar (ensayo 3, MfFB), mantenía un proceso de infección retardado en comparación con el ensayo 2 (aplicación de biol a sustrato, MfSB) y el tratamiento control (Mf, no aplicación de biol), el cual para el día 38 después de la infección con el patógenos los niveles de infección fueron similares entre todos los tratamientos (Figura 13).

El uso de consorcios de cepas de biocontroladores denominadas “Plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR), han demostrado en diversos ensayos controlados una mejor supresión de enfermedad y aumento en el control de la misma para múltiples patógenos de pepinos (Raupach & Kloepper, 1998). Algunos ensayos determinaron cepas elites de PGPR, involucradas como biocontroladores de patógenos foliares, de raíz y vasculares, y su vez involucradas en el desarrollo de la planta (Liu, Newman, McInroy, Hu, & Kloepper, 2017).

Por lo que, durante el tiempo final de ensayo no se obtuvo un desarrollo de infección del patógeno de acuerdo a lo deseado, tanto en el ensayo de aplicación foliar como



en ensayo de aplicación a sustrato con biol, en comparación con el control. Teniendo en cuenta que los factores externos ambientales (Temperatura y humedad) están altamente ligados a la eficiencia de infección de este patógeno, y los mismos no fueron controlados con eficacia durante el tiempo de los ensayos.



**Figura 13: Índice de Severidad de Infección.** MfSB: Indica el ensayo 2, de aplicación de biol al sustrato de las plantas infectadas con *P. fijiensis*; MfFB: indica ensayo 3, de aplicación de biol de manera foliar a plantas infectadas con *P. fijiensis*; Mf, representa el control usado para ambos tratamientos que, indica tratamiento sin aplicación de biol a plantas de banano infectadas con *M. fijiensis*. Indicando dpi: días post infección.

### 4.3 Determinación de Expresión Diferencial de Genes

#### 4.3.1 Identificación de Genes Expresados

##### 4.3.1.1 Ensayo 1, Aplicación de biofertilizante Biol en hojas de Banano:

Para este ensayo se enviaron a secuenciar un total de 384 ESTs contenidos en plásmidos pGEM (Promega Catálogo: A1360), de los cuales se obtuvieron un total de 374 secuencias para realizar análisis bioinformáticos y moleculares respectivos. Se determinaron un total de 310 secuencias con resultados de homologías en la base de datos (NCBI), donde se encontró aproximadamente un 4% de estas pertenecientes a bacterias. Las secuencias encontradas correspondían principalmente al género *Musa* (41%), de las cuales obtuvimos secuencias (~58%) con hits de proteínas hipotéticas y otras en secuencias no descritas (Anexo 4-5). Las clasificaciones iniciales de los biofertilizantes los clasificaban en tres tipos principales, donde dentro de uno de los tipos de biofertilizantes están caracterizados por contener microorganismos solubilizadores de fosfatos, principalmente *Bacillus*, *Aspergillus* y

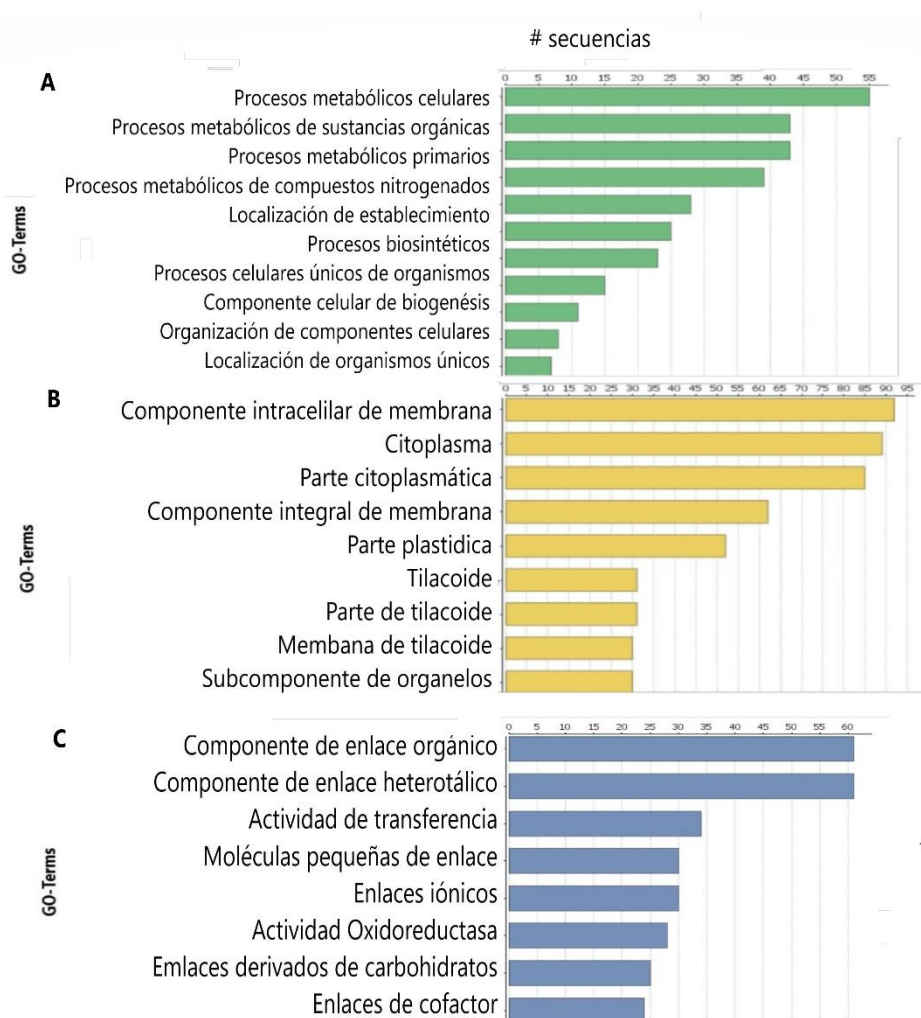
*Pseudomonas*, siendo este último género, las bacterias presentes en el ensayo (Ritika & Utpal, 2014).

Para la determinación de los procesos activados, se realizaron los análisis en tres funciones principales: i) procesos biológicos; ii) componentes celulares, y; iii) funciones moleculares; mediante Blast2GO. Se encontraron un total de 120 secuencias con hits anotados para proteínas, de los cuales se determinó un total de 78 secuencias involucradas en procesos biológicos, en el que 85% de estas están ligadas a procesos metabólicos, 84% a procesos celulares, 44.8% a procesos únicos de organismos, 23% a localización y 15% a componentes de organización celular, tomando en cuenta que muchos de estos genes están anotados en varios procesos biológicos intrínsecos de las células (cA).

Dentro del análisis de componentes celulares se determinó que un total de 97 secuencias se encontraban involucradas en este sistema, donde 94% están relacionadas a la formación de organelos, 92% forman parte de la estructura celular, 9.2% están relacionados a complejos macromoleculares, 72.16% están relacionados a membranas y 63.92% forman partes de membranas. Demostrando que los genes pueden cumplir diversos roles dentro de la célula (Figura 14B).

Para el análisis de las secuencias involucradas en funciones moleculares se estableció un total de 102 secuencias, de las que el 68.63% se encontraron dentro de actividades catalíticas y el 83.35% dentro de actividades de enlaces o uniones. Las actividades catalíticas encontradas, fueron transferasas y oxidoreductasas con un 33.3% y 27.4% respectivamente (Figura 14C).

Estudios de expresión de genes en la interacción simbiote de micorrizas con raíces de plantas encontró hexonas putativas de transportadores celulares, donde se asumió una importancia del transporte de aminoácidos, oligopéptidos, y polisacáridos indispensables en la simbiosis para estos organismos. De igual manera se demostró la importancia del rol que tienen las proteínas ricas en cisteína para la formación de una interfase simbiótica (Bonfante & Genre, 2010; Plett et al., 2011).



**Figura 14: Grafico del resultado de las secuencias anotadas según la base de datos usada (BLAST2Go) para el ensayo 1. A. Anotación obtenida para Procesos Biológicos; B. Anotaciones determinadas para Componentes Celulares; C. Anotaciones determinadas para Funciones Moleculares.**

#### 4.3.1.2 *Ensayo 2, Aplicación de biofertilizante biol en sustrato de plantas de banano infectadas con P. fijiensis*

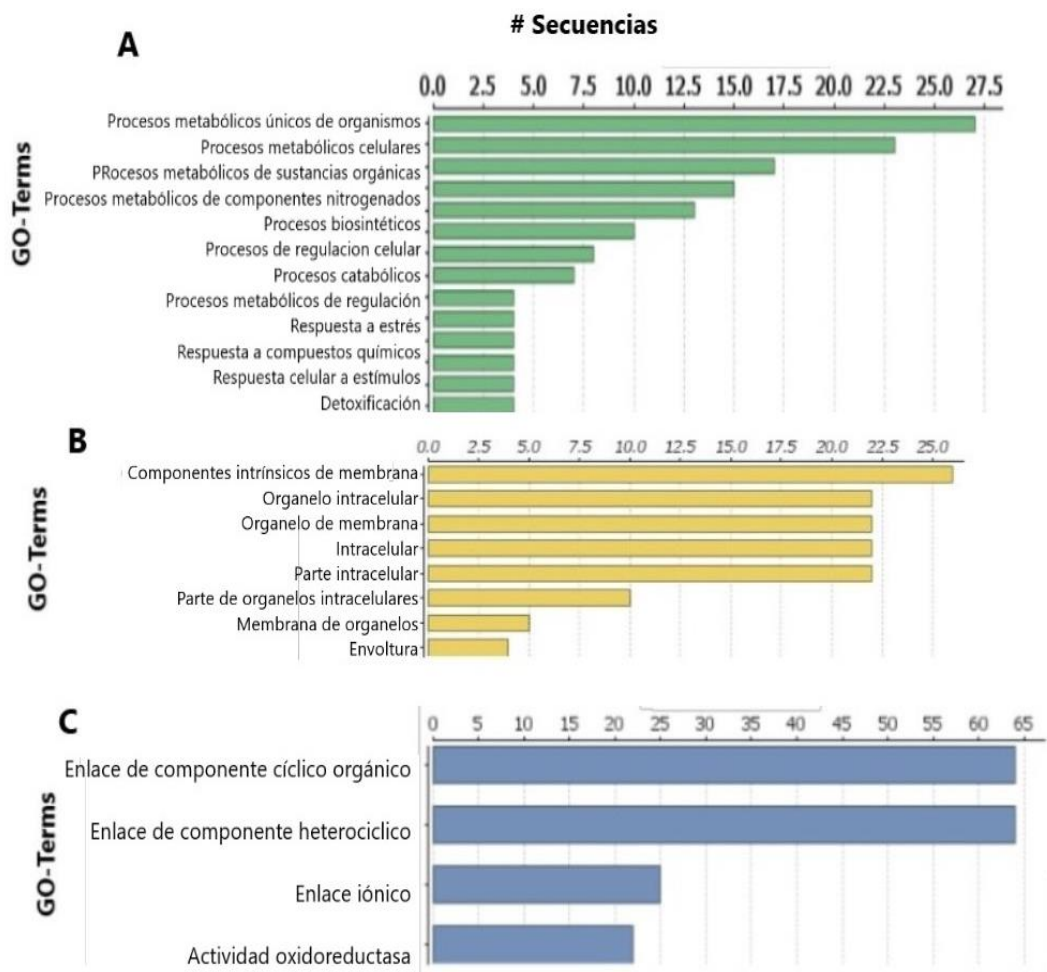
Para este ensayo se enviaron a secuenciar un total de 384 ESTs contenidos en plásmidos de transporte pGEM, obteniendo un total de 157 secuencias viables para realizar los análisis moleculares respectivos. Donde se obtuvo un total 96% de secuencias con homologías en la base de datos, dentro de las cuales se obtuvo un 30% de hits a bacterias. Las secuencias encontradas estaban lideradas por el género *Musa* (aprox 40%), donde muchas fueron ligadas a familias, superfamilias y dominios relacionados al crecimiento y respuestas intrínsecas

de la planta hacia diversos tipos de estrés (Anexo 5-6). Análisis similares de rutas de activación a través de metabolitos secundarios, demostraron una activación de rutas de biosíntesis celulares en plantas, mediante el uso de cepas elites aisladas para control específico de diversos patógenos (Liu et al., 2017). Para definir las rutas metabólicas activadas, se realizaron los análisis partiendo de un total de 80 secuencias de ESTs anotados según el programa utilizado (BLAST2GO). Se realizaron análisis en tres funciones principales: i) procesos biológicos; ii) componentes celulares, y; iii) funciones moleculares. Un 53% del total de secuencias tuvieron hits con proteínas descritas.

Los análisis realizados determinaron que, el 22% de las secuencias estuvieron involucradas en los procesos biológicos donde; 97% de estas secuencias estaban involucradas en procesos metabólicos, 73.5% en procesos celulares, 79.41% en procesos únicos de organismos, 17.65% en respuesta a estímulos, 20.5% a regulaciones biológicas, 20.5% a regulaciones de procesos biológicos y 11.76% a detoxificación, según se muestra en la Figura 15A. El presente análisis, sugiere que muchos de estos genes están involucrados en diversos componentes del sistema celular.

Los análisis de relación de secuencias al sistema de componentes celulares mostraron que un total de 41 secuencias (26%) estaban relacionados a éste. De este grupo, 53.66% estaban relacionadas a organelos, 53.66% a partes celulares, 53.66% con relación celular, 70.73% con relación a membranas. 65.85% a partes de membranas, 24.39% a partes de organelos y 9.76% relacionadas al complejo macromolecular (Figura 15B).

El análisis de secuencias relacionadas a funciones moleculares en este ensayo determinó un total de 71 secuencias (46.7%), relacionadas a estas actividades. De las cuales 97.1% están relacionadas a enlaces o uniones y el 39.44% a actividades catalíticas (Figura 15C). Dentro de estas se determinan que muchas de estas secuencias se encuentran hits de proteínas anotadas para múltiples funciones moleculares dentro de las células.



**Figura 15.** Grafico del resultado de las secuencias anotadas según la base de datos usada (BLAST2Go) para el ensayo 2. A. Anotación obtenida para Procesos Biológicos; B. Anotaciones determinadas para Componentes Celulares; C. Anotaciones determinadas para Funciones Moleculares

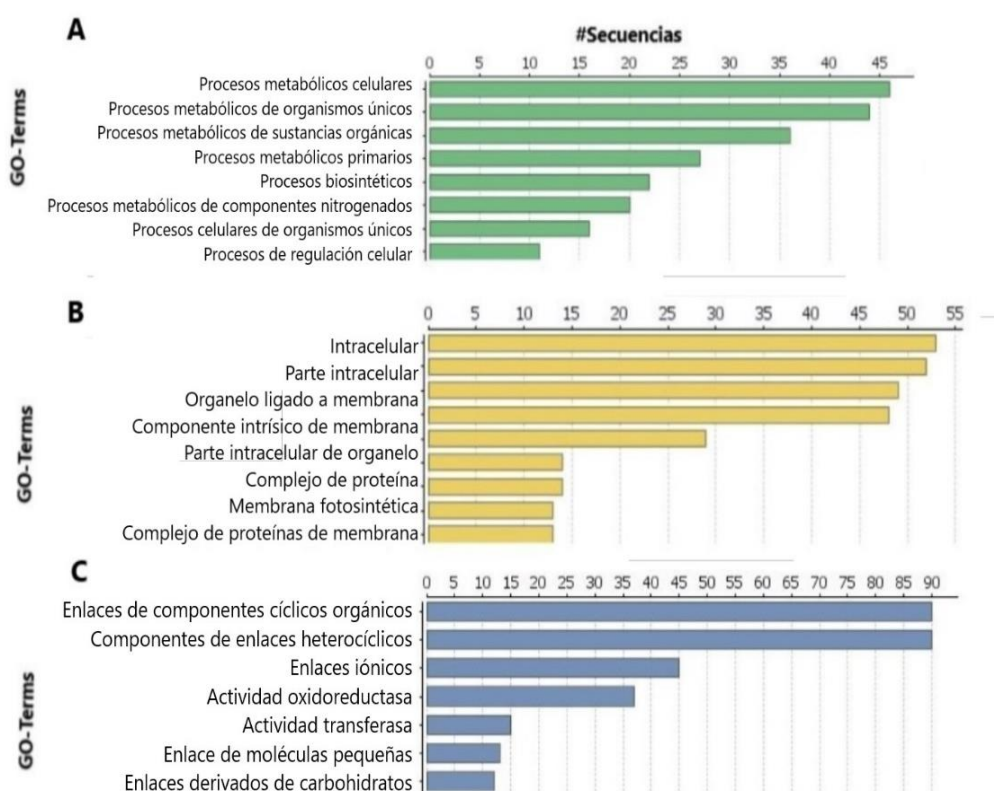
#### 4.3.1.3 Ensayo 3, Aplicación foliar de biol en plantas de banano previamente inoculadas con *P. fijiensis*

Para realizar los análisis moleculares en este ensayo, un total de 384 ESTs fueron enviados a secuenciar, estos estaban contenidos en plásmidos de transporte pGEM, obteniendo un total de 195 secuencias viables para realizar los análisis moleculares respectivos. De estas secuencias, más del 99% presentaron homologías en la base de datos, de las cuales 11% de los hits, se dieron a secuencias bacterianas. El mayor porcentaje de las secuencias correspondían al género *Musa* (51%), localizando principalmente genes

asociados a familias, superfamilias y dominios involucrados al crecimiento o respuestas intrínsecas de la planta hacia diversos tipos de estrés (Anexo 7-8).

Los análisis realizados mostraron dentro del programa utilizado (BLAST2GO) un total de 125 secuencias aproximadamente con proteínas anotadas. De los ESTs obtenidos en este ensayo un total de 77 secuencias (39%) se encontraban relacionadas a procesos biológicos, donde 94.81% de estas secuencias era parte de procesos metabólicos, 68.83% en procesos celulares, 58.44% en procesos únicos de organismos, 14.29% en regulaciones biológicas y 14.29% en regulación de procesos biológicos. Estas secuencias están relacionadas a múltiples procesos biológicos dentro de la planta según se muestra en la Figura 16A.

Los análisis de relación a componentes celulares mostraron un total de 72 EST relacionados. De este resultado el 76.39% mantenían relación a partes celulares, 29.17% a complejos de macromoléculas, 41.67% a partes de membranas y 19.44% a partes de organelos, donde la mayoría de estos ESTs se encontraron relacionados a varios procesos (Figura 16B).



**Figura 16.** Grafico del resultado de las secuencias anotadas según la base de datos usada (BLAST2Go) para el ensayo 3. A. Anotación obtenida para Procesos Biológicos; B. Anotaciones determinadas para Componentes Celulares; C. Anotaciones determinadas para Funciones Moleculares.

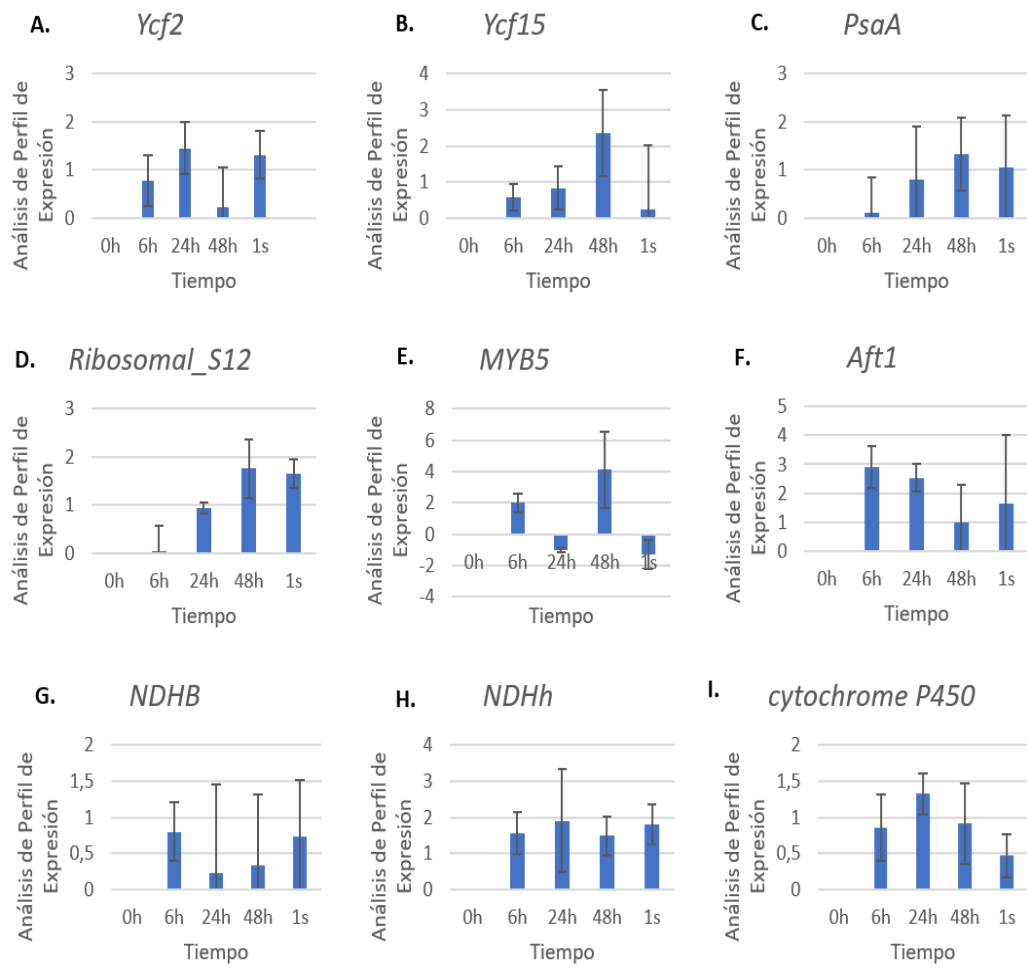
Este ensayo mostró que 99 de los ESTs (51%) estaban relacionados a funciones moleculares dentro del sistema celular de la planta. Donde, se determinó que 49.49% de estas secuencias formaban parte de actividades catalíticas con principal enfoque en actividades de oxidoreductasa y transferasa, mientras que el 94.95% de los ESTs estaban registrados en enlaces dentro de las células (Figura 16C).

#### 4.3.2 *Análisis de sobreexpresión de genes*

##### 4.3.2.1 *Ensayo 1, Aplicación de biofertilizante Biol en hojas de Banano:*

Análisis de activación de rutas metabólicas, conocidas por estar involucradas en procesos de resistencia a patógenos de manera intrínseca por parte de la planta, son realizados comúnmente. Se han determinado para el caso de PGPR (Plant growth-promoting rhizobacteria), que no solo generan crecimiento a la planta sino que actúan como agentes alternativos para el control de ataques de patógenos, como consorcios de *Bacillus subtilis*, que inducen resistencia por medio de la regulación de rutas metabólicas del ácido salicílico y el ácido jasmonico (Ryu, 2004).

Se realizó el análisis de expresión de un total de 9 genes relacionados al incremento del vigor híbrido de la planta como a la resistencia de diversos tipos de estrés de acuerdo con la base de datos. Donde, se obtuvo un incremento de expresión en los nueve genes analizados a partir de las 6 horas luego de aplicación de biol sobre las hojas de las plantas. Los genes *ycf2* y *ycf15*, aunque su función exacta es desconocida y en algunas investigaciones han determinado que existe una transcripción pero sin dar como resultado una proteína funcional, se han visto involucrados en ensayos de evolución entre especies (Schmitz-Linneweber et al., 2001; Shi et al., 2013), demostraron un incremento de expresión al transcurrir 48 y 24 horas respectivamente, pero el gen *ycf15* a la semana del tratamiento tuvo un decrecimiento en dicha expresión. Estos genes asociados a genes ya descritos confieren resistencia a las plantas debido a la reducción y destoxicación de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito e hidroperóxido orgánico a nivel celular (Ghosh, n.d.). El gen *Ribosomal\_S12* tuvo un incremento de la expresión a partir de la hora 24, luego de la aplicación de biol y su perfil de expresión aumentó para la hora 48, manteniéndose estable hasta finalizar el ensayo. El dominio *Aft1*, altamente asociado a respuestas en estrés osmóticos (Gao, Davidson, & Wahls, 2008), mantuvo un incremento en el perfil de expresión durante las horas 24 y 48 luego de lo cual este decreció. Se pudo determinar que el factor de transcripción *MYB5* mostró mayor nivel de expresión para las 6 y 48 horas, mientras que, para las 124 horas y 1 semana, tuvo una reducción en su expresión (Figura 17).



**Figura 17: Análisis de Perfiles de expresión de los genes escogidos en el ensayo 1.**  
N= 3 réplicas biológicas





## CONCLUSIONES

- La aplicación foliar de biol, como un fertilizante/estimulante biológico, genera incrementos tanto en el contenido de clorofila, como en el porcentaje del índice de la estabilidad de la membrana, donde al tener una relación directa con la fotosíntesis que realiza la planta podríamos decir que existe una mejora en la capacidad fotosintética en las plantas sometidas a este bioestimulante.
- Durante la infección del hongo *Pseudocercospora fijiensis*, el uso del biol de manera foliar, confirió a la planta la capacidad de mantener un alto porcentaje del índice de estabilidad de la membrana.
- La aplicación foliar demostró un retraso en el avance de la infección en la hoja por un tiempo limitado, hasta que finalmente los niveles de infección igualaron al tratamiento control, lo que puede indicar que existe la probabilidad de que el biol sea capaz de elicitar ciertos mecanismos de defensa en la planta, más estos no son duraderos con respecto al tiempo.
- El biol incrementó la expresión de varios genes, vinculados a los principales procesos biológicos de la planta que tentativamente están involucrados con el crecimiento y defensa de la misma.
- Las evaluaciones de expresión de genes mostraron ESTs dentro de procesos biológicos relacionados a respuesta a estímulos externos (bióticos o abióticos).
- Los genes analizados mostraron un incremento en su expresión al realizarse la aplicación de biol.

## RECOMENDACIONES

- Los análisis realizados en este ensayo son realizados en un corto periodo de tiempo, para determinar el estímulo de crecimiento de las plantas luego de la aplicación de biol, es recomendable realizar estos análisis en un tiempo de ensayo más extenso, de manera que se puedan observar cambios fisiológicos diferenciados de los controles. Donde, se incluyan procesos de aplicación de biol con tiempos más distantes entre ellos.
- Debería tenerse en cuenta los cambios de temperatura en los invernaderos, debido a que esto juega un rol importante en la infección del patógeno en las plantas.
- El ensayo podría llevarse a cabo en cultivos de campo para poder observar los cambios fisiológicos y moleculares en condiciones reales.
- Los análisis moleculares deberían incluir el análisis de rutas metabólicas para aquellas plantas que sufrieron una condición a estrés biótico.
- Realizar análisis en los procesos biológicos importantes como aquellos que se encontraron relacionados a respuesta a estímulos que no han sido estudiados en este ensayo.
- Debido a la importancia de los resultados obtenidos y la relevancia de este estudio de biol, sería ideal la realización de un estudio transcriptómico.

## REFERENCIA

- Abiodun, J., Osaretin, B. I., Elizabeth, T. A., Benson, O. A., & Ajibola, P. A. (2017). Effectiveness of *Pseudomonas* species in the management of tomato early blight pathogen *Alternaria solani*. *African Journal of Microbiology Research*, *11*(23), 972–976. <https://doi.org/10.5897/AJMR2017.8564>
- Agrios, G. N. (1988). Plant pathology. In *Plant pathology*. (p. xvi + 803 pp.).
- Atlas, R. M. (2005). *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1201/9781420037487>
- Babaei, K., Seyed Sharifi, R., Pirzad, A., & Khalilzadeh, R. (2017). Effects of bio fertilizer and nano Zn-Fe oxide on physiological traits, antioxidant enzymes activity and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. *Journal of Plant Interactions*, *12*(1), 381–389. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1371798>
- Backman, P. a., & Sikora, R. a. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, *46*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.03.009>
- Becker, D. K., Dugdale, B., Smith, M. K., Harding, R. M., & Dale, J. L. (2000). Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv “Grand Nain” via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, *19*(3), 229–234. <https://doi.org/10.1007/s002990050004>
- Bhardwaj, D., Ansari, M., Sahoo, R., & Tuteja, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories*, *13*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>
- Bonfante, P., & Genre, A. (2010). Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, *1*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>
- Bowles, D. J. (1990). Defense-Related Proteins in Higher Plants. *Annual Review of Biochemistry*, *59*(1), 873–907. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.59.070190.004301>
- Brent, K. J., & Hollomon, D. W. (2007). *Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?* *FRAC Monograph 1, 2nd edition, Brussels: FRAC*. <https://doi.org/D/1995/2537/1>
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, *383*(1–2), 3–41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Chavez, E. (2009). *Determinacion de la Calidad de Biofertilizantes Liquidos y Estudio del Potencial para l aInhibicion de Pseudocercospora fijiensis (Morelet) en condiciones controladas y como alternativa en el mano de Sigatoka Negra en sistemas de Produccion*

*Organica*. ESPOL.

- Chavez, E., Leon, R., Ruiz, O., Averos, C., & Peralta, E. (2011). Aplicación de biofertilizantes líquidos de producción local y su efecto en la rehabilitación de plantaciones de cacao fino y de aroma. Piura.
- Collinge, D., Kragh, K., Mikkelsen, J., Nielsen, K., Rasmussen, U., & Vad, K. (1993). Plant chitinases. *The Plant Journal*, 3(1), 31–40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1993.t01-1-00999.x>
- Croft, K., Juttner, F., & Slusarenko, a. J. (1993). Volatile Products of the Lipoxygenase Pathway Evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) Leaves Inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology*, 101(1), 13–24. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.13>
- Dangl, J., Dietrich, R., & Richberg, M. (1996). Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *The Plant Cell*, 8(10), 1793–1807. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1793>
- Daniells, J., Frison, E., Karamura, D., Jenny, C., Lescot, T., Sharrock, S., ... Swennen, R. (2001). *Musalogue: A Catalogue of Musa Germplasm, Diversity in the Genus Musa*. CIRAD.
- Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator. (2008). The Biology of *Musa* L. (banana), 1, 1–48.
- Dinu, M., Dumitru, M. G., & Soare, R. (2015). THE EFFECT OF SOME BIOFERTILIZERS ON THE BIOCHEMICAL COMPONENTS OF THE TOMATO PLANTS AND FRUITS. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 21(5), 998–1004.
- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1085. <https://doi.org/10.2307/3870059>
- Doke, N. (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological Plant Pathology*, 23(3), 345–357. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(83\)90019-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(83)90019-X)
- Doke, N., & Ohashi, Y. (1988). Involvement of an O<sub>2</sub>- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 32(1), 163–175. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(88\)80013-4](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(88)80013-4)
- FAO. (2002). *Los fertilizantes y su uso. Ifa*. <https://doi.org/fertuso.pdf>
- FAO. (2015). *FAO Statistical Pocketbook 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <https://doi.org/978-92-5-108802-9>
- Finck, A. (1985). *Fertilizantes y fertilización : fundamentos y métodos para la fertilización de*

*los cultivos*. Reverté.

- FRAC. (2012). Fungicide resistance management strategies. *2012 Banana Working Group Meeting.*, 1–11.
- Gao, J., Davidson, M. K., & Wahls, W. P. (2008). Distinct regions of ATF/CREB proteins Atf1 and Pcr1 control recombination hotspot *ade6-M26* and the osmotic stress response. *Nucleic Acids Research*, *36*(9), 2838–2851. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn037>
- Ghosh, N. (n.d.). Promoting Bio-fertilizers in Indian Agriculture Promoting Bio-fertilizers in Indian Agriculture. *Growth (Lakeland)*, 1–26.
- Groom, Q. J., Torres, M. A., Fordham-Skelton, A. P., Hammond-Kosack, K. E., Robinson, N. J., & Jones, J. D. G. (1996). *rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91phox respiratory burst oxidase gene. *Plant Journal*, *10*(3), 515–522. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10030515.x>
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (1996). Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *The Plant Cell*, *8*(10), 1773. <https://doi.org/10.2307/3870229>
- Hansen, G., & Wright, M. S. (1999). Recent advances in the transformation of plants. *Trends in Plant Science*. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01412-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01412-0)
- Houllou-Kido, L. M., Kido, E. A., Falco, M. C., De Castro Silva Filho, M., De Oliveira Figueira, A. V., De Lima Nogueira, N., ... Neto, A. T. (2005). Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *40*(11), 1081–1086. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005001100005>
- ICAR Research Complex. (1999). *Use of Bio-Fertilizers*. Kendra.
- INEC. (2009). Análisis del Sistema Agroalimentario del Banano en el Ecuador, 2–33.
- Jansen, A., & Aparcana Robles, S. (2008). Estudio sobre el Valor Fertilizante de los Productos del Proceso “ Fermentación Anaeróbica ” para Producción de Biogás, 1–10.
- Keppler, D. L., & Novacky, A. (1985). Involvement of Membrane Lipid Peroxidation in the Development of a Bacterially Induced Hypersensitive Reaction. *Physiology and Biochemistry*, *76*, 104–108.
- Kole, C. (2007). Fruits and nuts. In *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants* (p. 370). Springer.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D. G., & Bécard, G. (2003). A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, *131*(3), 952–962. <https://doi.org/10.1104/pp.011882>

- Kuck, K. H., & Gisi, U. (2008). FRAC Mode of Action Classification and Resistance Risk of Fungicides. In *Modern Crop Protection Compounds* (Vol. 1, pp. 415–432). <https://doi.org/10.1002/9783527619580.ch12>
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583–593. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90544-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90544-4)
- Liu, K., Newman, M., McInroy, J. A., Hu, C.-H., & Kloepper, J. W. (2017). Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for biological control of multiple plant diseases. *Phytopathology*, PHYTO-02-17-0051-R. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0051-R>
- Magdama, F., Maridueña, M., Villavicencio, M., & Peralta, E. (2011). BIOLES: BIOFERTILIZANTES CON PROPIEDADES FUNGICIDAS Y SU USO EN EL CONTROL DE LA MONILIASIS.
- Mehdy, M. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiology*, 105(2), 468–472. <https://doi.org/10.1093/plphys/105/2/467> [pii]
- Melchers, L. S., Groot, M. A., Van Der Knaap, J. A., Ponstein, A. S., Sela-Burlage, M. B., Bol, J. F., ... Linthorst, H. J. M. (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *The Plant Journal*, 5(4), 469–480. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1994.05040469.x>
- Mittler, R., & Lam, E. (1996). Sacrifice in the face of foes: Pathogen-induced programmed cell death in plants. *Trends in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)81499-5](https://doi.org/10.1016/0966-842X(96)81499-5)
- Nobbe, F., & Hiltner, L. (1896). Inoculation of the soil for cultivating leguminous plants. US.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, 78(3), 449–460. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90423-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90423-5)
- OECD. (2009). *CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF BANANAS AND PLANTAINS (Musa spp.)*. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology (Vol. 43). OECD.
- Osborn, A. E. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *THE PLANT CELL ONLINE*, 8(10), 1821–1831. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1821>
- Plett, J. M., Kemppainen, M., Kale, S. D., Kohler, A., Legué, V., Brun, A., ... Martin, F. (2011). A secreted effector protein of laccaria bicolor is required for symbiosis development. *Current Biology*, 21(14), 1197–1203. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.033>

- Ploetz, R. (2000). Black sigatoka. *Pesticide Outlook*, 11(1), 19–23. <https://doi.org/10.1039/b006308h>
- Ploetz, R. C. (2001). Black Sigatoka of Banana. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2001-0126-02>
- Pocasangre, L. E., Ploetz, R. C., Molina, A., & Perez Vicente, L. (2011). Raising Awareness of the Threat of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Latin America and the Caribbean. *Acta Horticulturae ISHS*, 897.
- ProEcuador. (2013). Análisis del sector banano 2013. *Revista Latinoamericana Ecuador*, 1–30.
- Rajasekaran, S., Sundaramoorthy, P., & Sankar Ganesh, K. (2015). Effect of FYM, N, P fertilizers and biofertilizers on germination and growth of paddy (*Oryza sativa*. L). *International Letters of Natural Sciences*, 35, 59–65.
- Raupach, G. S., & Kloepper, J. W. (1998). Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, 88(11), 1158–1164. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1158>
- Ritika, B., & Utpal, D. (2014). Biofertilizer, a way towards organic agriculture: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 8(24), 2332–2343. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6374>
- Rivas, G., & Rosales, F. (2003). *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musaceas en los tropicos. Manejo Convencional*.
- RStudio Team, -. (2016). RStudio: Integrated Development for R. [Online] RStudio, Inc., Boston, MA URL <Http://www.Rstudio.Com>, RStudio, Inc., Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2340-5>
- Russell, P. E. (2009). Fungicide resistance action committee (FRAC): A resistance activity update. *Outlooks on Pest Management*, 20(3), 122–125. <https://doi.org/10.1564/20jun08>
- Ryu, C.-M. (2004). Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 134(3), 1017–1026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- Sanchez Timm, L. E., & Santos Ordoñez, E. G. (2010). *Revista tecnológica. Revista Tecnológica - ESPOL* (Vol. 23). Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).
- Schmitz-Linneweber, C., Maier, R. M., Alcaraz, J. P., Cottet, A., Herrmann, R. G., & Mache, R. (2001). The plastid chromosome of spinach (*Spinacia oleracea*): complete nucleotide sequence and gene organization. *Plant Molecular Biology*, 45, 307–315. <https://doi.org/10.1023/A:1006478403810>
- Segal, A. W., & Abo, A. (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes.



*Trends in Biochemical Sciences*, 18(2), 43–47. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90051-N](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90051-N)

Shi, C., Liu, Y., Huang, H., Xia, E. H., Zhang, H. Bin, & Gao, L. Z. (2013). Contradiction between Plastid Gene Transcription and Function Due to Complex Posttranscriptional Splicing: An Exemplary Study of *ycf15* Function and Evolution in Angiosperms. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059620>

Slusarenko, A. (1996). The Role of Lipoxygenase in Plant Resistance to Infection. In *Lipoxygenase and Lipoxygenase Pathway Enzymes* (pp. 176–197). AOCS Publishing. <https://doi.org/10.1201/9781439831977.ch10>

Smith, C. J. (1996). Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist*, 132(1), 1–45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04506.x>

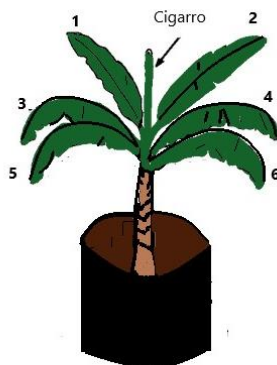
Sotomayor, I. (2012). *La Raza Tropical 4 de Mal de Panamá: Amenaza Potencial para la Industria Bananera y Platanera del Ecuador*. Quevedo.

Stover, R. H. (1980). Sigatoka Leaf Spots of Bananas and Plantains. *Tropical Agriculture Research Services*.

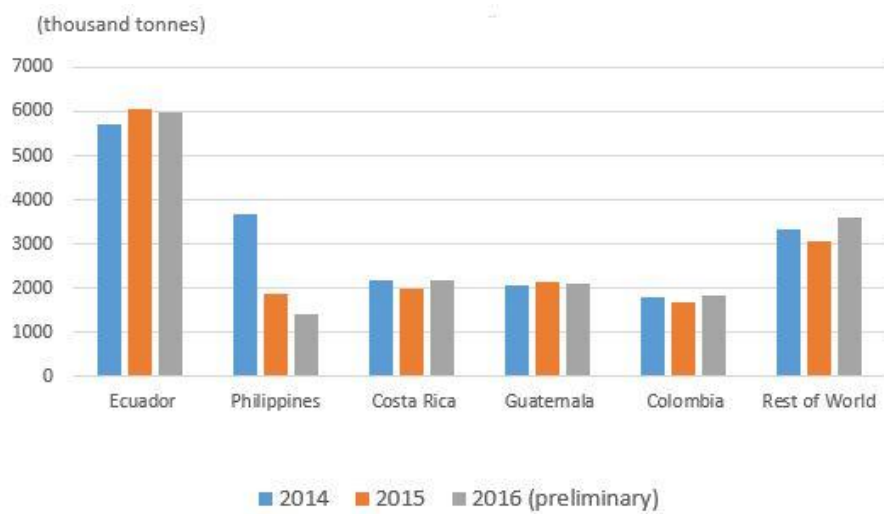
Sutherland, M. W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(91\)90020-I](https://doi.org/10.1016/0885-5765(91)90020-I)

## **ANEXOS**

**Anexo 2:** Esquema de numeración de hojas de banano de manera referencial



**Anexo 3:** Exportaciones de Banano a nivel mundial



**Anexo 4:** Descripción de genes homólogo y primers usados para el análisis de expresión en el ensayo 1

homologo	Actividad Relacionada	Procesos Biológicos	Función Molecular	Componente Celular	Código	primers 5'-3'	TM	gc%	TA
rpoC2	catalizador de transcripción de ADN-ARN	Transcripción	Enlace de ADN	plastidos	246-T1-F	TCGCGTAAACGATTGTCTG	59,87	45	150
					246-T1-R	ACCGTTCAAGGCAAGACAAG	60,29	50	
GRF6	Factor de transcripción envuelto a respuesta a estrés	Respuesta de defensa a bacterias Respuesta a iones de cadmio Respuesta a frio	Enlace de dominios específicos de proteínas	Membrana celular citoplasma núcleo	296-T1-F	CCGAGGGTACTGGAAAATCA	59,93	50	145
					296-T1-R	CATTGTCAGGTGGGGAGTTT	59,82	50	
yfc2	probable relación con fotosíntesis	Importación de proteínas dentro de estroma de cloroplasto	Enlace de ATP	Estroma de cloroplasto	305-T1-F	AATCCGATTCGTCTGATTC	60,04	45	188
					305-T1-R	AAGGGGAGGGTTTCTTCAA	59,91	45	
Cytochrome P450	transferencia de electrones en la membrana	Desarrollo de raíces Procesos metabólicos de thalianol	Enlace de iones de hierro Actividad oxidoreductasa Actividad hydroxylase thalianol	Subcompartiment o del retículo endoplasmatico	341-T2-F	GTATTGAGCCCCAACTTT	60,32	50	157
					341-T2-R	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	60,03	50	
RNAP_beta '_N	catalizador de transcripción de ADN-ARN	Transcripción	Enlace de AD Actividad de polimerasa	No predicha	398-T1-F	AGCAGTGGCTTGTGGAAAC	60,3	50	144
					398-T1-R	GCCGATCTGGTCTTTCACA	59,78	52,63	
MYB5	activador de transcripción	Transcripción Regulador de transcripción	Activador Enlace de ADN Represor	Núcleo	474-T1-F	GAGCTGTGCATAAGCCTTCC	59,98	55	110
					474-T1-R	TTGACTCCTTGTCTTCTG	60,18	50	
NADH	transportadores de electrones	Biosíntesis de aminoácidos biosíntesis de glutamato	Oxidoreductasa	Cloroplastos	521-T2-F	TTGGGGCTTCTACTCTCACG	60,39	55	155
					521-T2-R	TCCTGGAGGACCTATGAGA	59,61	55	
Ribosomal_S12_like	familia de proteínas S12, rol en la translocación en la elongación de péptidos en la síntesis de proteínas	Traducción	Enlace de rARN Estructura constituyente del ribosoma	Cloroplastos Estroma de cloroplastos plastido	541-T1-F	ATCGAATACGGCTTTCACA	60,47	45	105
					541-T1-R	AGCAGGAAAAGGAGGGAAAC	59,69	50	
psaA	proteínas de membranas que actúan en el fotosistema I	Fotosíntesis protein-chromophore linkage	Oxidoreductase	membrana de tilacoide de Cloroplastos	556-T2-F	GCATCAGCATGTAGGTCCA	59,68	50	179
					556-T2-R	GTCCGAAAGAGGAGGACTT	59,68	55	
ndhB	transportadores de electrones	transporte de electrones	Oxidoreductasa	membrana de tilacoide de Cloroplastos	570-T1-F	ATGGCAGGCAGGCCTATATT	60,81	50	129
					570-T1-R	CGCACGTAAGGGGTTATTTC	59,47	50	
Ycf15	probable relación con fotosíntesis			cloroplastos	576-T1-F	CTCGGTCAACCGGAATATGT	59,81	50	162
					576-T1-R	CATGTCCGATGAAATGCTTG	60,07	45	

**Anexo 5:** Proteínas homologas obtenidas por medio de BLASTX de los ESTs obtenidos de la librería genética en el ensayo 1. Anexo 5: continua

<b>Proteína Relacionada</b>	<b>Número de Repeticiones</b>	<b>Organismo</b>
18S ribosomal RNA gene	1	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC MA4-125A12	1	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC MA4-52N2	1	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC OPBa0008J05rc_JM4	1	<i>Oryza punctata</i>
coi genes for putative cytochrome C oxidase proteins	1	<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>
histone H2A.2	1	<i>Musa acuminata</i>
mannose-binding lectin	1	<i>Musa acuminata</i>
Ty3-gypsy-like retrotransposon	1	<i>Musa acuminata</i>
1-Cys peroxiredoxin	1	<i>Musa acuminata</i>
2,4-dienoyl-CoA reductase	1	<i>Pseudomonas sp. Ag1</i>
50S ribosomal protein L2	1	<i>Medicago truncatula</i>
5S ribosomal RNA gene	2	<i>Allium grayi</i>
acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase	2	<i>Pseudomonas sp.</i>
ATP synthase CF0 subunit I	1	<i>Rhazya stricta</i>
BAC clone:MBP_31007	1	<i>Musa balbisiana</i>
BAC MA4-99N22	1	<i>Musa acuminata</i>
BAC MBP-64B17	1	<i>Musa balbisiana</i>
CEgs750 18S ribosomal RNA gene	4	<i>Musa environmental</i>
chloroplast	4	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC MA4-30C11	1	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC MA4-3F3	13	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC MA4-3G18	1	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC MA4-71P20	2	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC MA4-72F16	5	<i>Musa acuminata</i>
clone BAC MAC-77E20	1	<i>Musa acuminata</i>
clone MuG9	1	<i>Musa acuminata</i>
clone Radka1 26S ribosomal RNA	4	<i>Musa acuminata</i>
Coiled-coil domain-containing protein 55, putative isoform 1	1	<i>Theobroma cacao</i>
Cysteine-rich RLK	1	<i>Theobroma cacao</i>
cytochrome c heme attachment protein	2	<i>Musa acuminata</i>
cytochrome c heme attachment protein	3	<i>Musa acuminata</i>
cytochrome P450 like_TBP	1	<i>Nicotiana tabacum</i>
envelope membrane protein	2	<i>Musa acuminata</i>
GTP-binding nuclear protein Ran-A1	3	<i>Zea mays</i>
hypothetical chloroplast RF2	1	<i>Saruma henryi</i>
hypothetical chloroplast RF21	1	<i>Allium fistulosum</i>
hypothetical protein	1	<i>Bacillus thuringiensis</i>

<b>Proteína Relacionada</b>	<b>Número de Repeticiones</b>	<b>Organismo</b>
linoleate 9S-lipoxygenase 4	1	<i>Musa acuminata</i>
LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	2	<i>Musa acuminata</i>
MA4_112I10	10	<i>Musa acuminata</i>
mRNA for immune mapped protein 1	1	<i>Eimeria maxima</i>
MuTR repeat element	1	<i>Musa balbisiana</i>
myb-related protein Hv1	4	<i>Musa acuminata</i>
NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 2 B, chloroplastic	1	<i>Camelina sativa</i>
NADH dehydrogenase subunit B	11	<i>Typha latifolia</i>
NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 7	10	<i>Musa acuminata</i>
ninein-like protein isoform X1	1	<i>Struthio camelus australis</i>
nitrite reductase	1	<i>bacteria</i>
orf137	1	<i>Pharus latifolius</i>
ORF46e	2	<i>Pinus koraiensis</i>
pentatricopeptide repeat-containing protein At5g27110-like	1	<i>Musa acuminata</i>
photosystem I P700 apoprotein A2	1	<i>Fragaria pentaphylla</i>
plastid, complete genome	1	<i>Musa textilis</i>
polygalacturonase	2	<i>Musa acuminata</i>
polyprotein-like protein	1	<i>Musa acuminata</i>
protein AMTR	3	<i>Amborella trichopoda</i>
protein ArthMp093	1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
protein B456_001G166200	1	<i>Gossypium raimondii</i>
protein BVRB	3	<i>Beta vulgaris</i>
protein BVRB	1	<i>Beta vulgaris</i>
protein CICLE	4	<i>Citrus clementina</i>
protein G7K	3	<i>Saitoella complicata</i>
protein LOC104878589	2	<i>Vitis vinifera</i>
protein M569	1	<i>Genlisea aurea</i>
protein MA4	34	<i>Musa acuminata</i>
protein NitaMp008		<i>Nicotiana tabacum</i>
protein PhapfoPp054	2	<i>Phalaenopsis aphrodite subsp. formosana</i>
protein POPTR	1	<i>Populus trichocarpa</i>
protein Q072		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
protein RF2	2	<i>Musa acuminata</i>
protein SORBIDRAFT	2	<i>Sorghum bicolor</i>
protein SOVF	1	<i>Spinacia oleracea</i>
protein VITISV	5	<i>Vitis vinifera</i>
protein ZEAMMB73_453609	1	<i>Zea mays</i>
putative retinoic acid converting enzyme	1	<i>Hirudo medicinalis</i>

<b>Proteína Relacionada</b>	<b>Número de Repeticiones</b>	<b>Organismo</b>
Retrotransposon protein	1	<i>Theobroma cacao</i>
retrotransposon protein, putative, Ty1	2	<i>Oryza sativa</i>
ribosomal protein L20	2	<i>Musa acuminata</i>
ribosomal protein S12	1	<i>Cynomorium songaricum</i>
ribosomal protein S14	1	<i>Heliconia collinsiana</i>
RNA polymerase beta" subunit	6	<i>Zea mays</i>
rpoC2	9	<i>Musa acuminata</i>
SBW25	3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Select seprotein ArthMp093	1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
SH3 domain-containing protein	9	<i>Musa acuminata</i>
signal transduction protein	1	<i>Herbaspirillum frisingense</i>
TKP	1	<i>Pseudomonas sp</i>
transposase IS630	1	<i>Listonella anguillarum</i>
uncharacterized protein LOC102630744 isoform X1	1	<i>Citrus sinensis</i>
uncharacterized protein LOC102667256	4	<i>Glycine max</i>
uncharacterized protein LOC103982574	5	<i>Musa acuminata</i>
uncharacterized protein LOC104228850	2	<i>Nicotiana glauca</i>
uncharacterized protein LOC104877726	3	<i>Vitis vinifera</i>
uncharacterized protein LOC104884178	5	<i>Beta vulgaris</i>
uncharacterized protein LOC105037131	4	<i>Elaeis guineensis</i>
uncharacterized protein LOC105178433	1	<i>Sesamum indicum</i>
uncharacterized protein LOC105434474	1	<i>Cucumis sativus</i>
uncharacterized protein LOC106359176	4	<i>Brassica napus</i>
ycf2	13	<i>Musa acuminata</i>
ycf68	3	<i>Nymphaea alba</i>

**Anexo 6:** Dominios y Familias principales obtenidas mediante BLASTx de la librería genética en el ensayo 1

<b>Dominio/Familia</b>	<b>Número de Repeticiones</b>	<b>Función relacionada</b>
1-cys PRX subfamily	3	desintoxicación de peróxido en la célula
Aft1 HRA domain	9	factor de transcripción asociado a respuesta a estrés
atpF		transporte de protones
CemA	2	Transporte de CO <sub>2</sub>
C-terminal domain	9	Síntesis de ARN en la célula
cytochr_II_ccsB	1	ATP binding cassette, transportador de ATP
Cytochrome P450 likeTBP	1	transferencia de electrones en la membrana
DUF2647	1	proteínas anotadas sin función específica definida
DUF4283	3	Guía y enlace de regiones
LarA	1	biogénesis
LRR	4	multi domains
Myb_DNA-binding	5	Regulación de la síntesis del mucílago, del desarrollo de la semilla y morfogénesis
ndhA	21	Respiración celular
P-loop NTPase domain	1	Múltiples actividades celulares
psaB	1	fotosíntesis
Ran/TC4 family of small GTPases	4	Funciones biológicas como transporte celular
Ribosomal_L2_C	2	Traducción
Ribosomal_S12_like	1	Translocación en la polimerización de péptidos
RNAP_beta'_N	1	Síntesis de ARN en la célula
rpl20	2	Traducción
RT, RNA-dependent DNA polymerase	1	Retrotransposones
RT_LTR	4	Retrotransposones
RVT_2	3	Retrotransposones
UBN2_2	1	Retrotransposones
ycf	22	actividad específica no definida
zf-RVT	4	procesos de transcripción



**Anexo 7:** Proteínas homologas obtenidas por medio de BLASTX de los ESTs obtenidos de la librería genética en el ensayo 2. Anexo 7: continua.

Proteína Relacionada	Numero de Repeticiones	Organismo
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
BAG family molecular chaperone regulator 6-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 3 isoform X1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
cation transport regulator-like protein 2	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
cingulin-like protein 1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
conserved oligomeric Golgi complex subunit 1-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
cryptochrome-1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
cyclin-T1-3-like isoform X1	2	Musa acuminata subsp. malaccensis
cysteine proteinase 1-like	3	Musa acuminata subsp. malaccensis
dnaJ protein homolog	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
fibropellin-1-like	2	Xenopus tropicalis
glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
lipase-like isoform X2	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
monodehydroascorbate reductase-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
monothiol glutaredoxin-S11-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
arginine/serine-rich coiled-coil protein 2 (LOC103977604), mRNA	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
NAC domain-containing protein 21/22-like	5	Musa acuminata subsp. malaccensis
peroxiredoxin Q, chloroplastic	2	Musa acuminata subsp. malaccensis
photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplastic	2	Musa acuminata subsp. malaccensis
pre-mRNA-splicing factor SLU7-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
probable cytochrome P450 4ac1	3	Bactrocera dorsalis
probable E3 ubiquitin-protein ligase HIP1 isoform X2	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
protein ALWAYS EARLY 3-like isoform X4	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
protein NLP3-like isoform X2	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
putative aconitate hydratase, cytoplasmic	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
scarecrow-like protein 1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
shaggy-related protein kinase alpha-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
SWI/SNF chromatin-remodeling complex subunit SNF5-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
translationally-controlled tumor protein homolog	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
ubiquitin-activating enzyme E1 2-like isoform X1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
uncharacterized protein LOC103984717	7	Musa acuminata subsp. malaccensis
UPF0496 protein 4-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
CP47 protein	1	Rapatea sp. Chase 195
cytochrome c oxidase subunit 1 (mitochondrion)	1	Schrenkiella parvula
dinitrogenase reductase	1	bacteria

<b>Proteína Relacionada</b>	<b>Numero de Repeticiones</b>	<b>Organismo</b>
hypothetical protein AMTR_s00103p00141530	1	Amborella trichopoda
hypothetical protein B456_012G044100	1	Gossypium raimondii
hypothetical protein BBAD15_m00022	3	Beauveria bassiana D1-5
hypothetical protein Ccrd_023064	1	Cynara cardunculus var. scolymus
hypothetical protein CISIN_1g029675mg	1	Citrus sinensis
hypothetical protein DCAR_001522	3	Daucus carota subsp. sativus
hypothetical protein M569_00360	1	Genlisea aurea
hypothetical protein MIMGU_mgv1a024202mg, partial	3	Erythranthe guttata
hypothetical protein MTR_3g035620	3	Medicago truncatula
hypothetical protein VITISV_009275	1	Vitis vinifera
MADS FLC-like protein 2	13	Cichorium intybus
manganese superoxide dismutase	1	Taiwanofungus camphoratus
matK	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
maturase K	3	Musa acuminata subsp. malaccensis
MPBQ methyltransferase	1	Triticum aestivum
N-acetylglucosaminyltransferase	1	Bradyrhizobium sp. ISLU256
NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 5	1	Heliconia collinsiana
nitrogenase reductase	4	bacteria
ORF124	3	Pinus koraiensis
photosystem I apoprotein A2	3	Cenchrus americanus
photosystem II protein Z	1	Phalaenopsis aphrodite subsp. formosana
predicted protein	4	Nematostella vectensis
protein TAR1	1	Kluyveromyces marxianus
PsaB	1	Lippia alba
putative retinoic acid converting enzyme	13	Hirudo medicinalis
ribosomal protein S12	3	Angiopteris evecta
ribosomal protein S2	1	Xiphidium caeruleum
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	2	Ceroxylon echinulatum
RNA polymerase beta subunit	1	Musa acuminata
Rpl14	1	Pera bumeliifolia
transposase IS630	48	Listonella anguillarum serovar O2

**Anexo 8:** Descripción de superfamilias y dominios encontrados en la librería genética obtenida en el ensayo 2. Anexo 8: continua.

<b>Familia/Dominio</b>	<b>Numero de Repeticiones</b>	<b>Función</b>
ANK	1	inhibición en ciclos celulares
Ank_4	1	Transportador PPI
atpB	1	actividad catalítica
ChaC	1	Catalizador de ácido PyroGlutamico
Cryptochrome_C	1	Fotoreceptores
Cyt_c_Oxidase_I	1	Cadena Respiratorio
DnaJ_C	1	Oligomerización y desnaturalización de polipéptidos
DUF3675	1	Anclaje de iones de Zinc
F1-ATPase_beta	1	funciones intracelulares
GcvP2	1	Catalizador
GRAS	1	Señalizador de Giberelinas
GRX_PICOT_like	1	Actividad REDOX
matK	4	Anclaje de ARN
MatK_N	4	Anclaje de ARN
NAM	1	Meristemal
ndhF	1	Cadena fotosintética
Peptidase_C1	1	antibióticos
PLN00053	2	Envolvimiento de oxígeno en el complejo de Fotosistema II
PLN00070	1	Catalizador del isocitrato
PLN00223	1	cadena catalizadora
PLN02356	1	catalizador de reemplazamiento y eliminación de reacciones beta
PLN02414	2	metabolismo para energía
PLN02490	1	metilación
PLN02556	1	catalizador de reemplazamiento y eliminación de reacciones beta
psaB	1	fotosíntesis
psaJ	8	fotosíntesis
psbB	1	fotosíntesis
psbZ	2	fotosíntesis
PTZ00036	1	catalizador de glicógeno a glucosa
PTZ00037	1	Oligomerización y desnaturalización de polipéptidos
PTZ00203	1	anclaje de proteínas
Pyr_redox_2	1	oxidoreductasa
rbcl	1	Regulador en RUBISCO
Ribosomal_S12_like	2	Translocación en síntesis de proteína
RNAP_beta'_C	1	catalizador de transcripción de ADN-ARN

<b>Familia/Dominio</b>	<b>Numero de Repeticiones</b>	<b>Función</b>
rpl14	1	Estructura del Ribosoma
rps16	1	anclaje de ARN
rps2	3	complejo de traducción
rpsB	1	complejo de traducción
rpsP	1	complejo de traducción
RuBisCO_large_I	2	Ciclo de Calvin
SMAP	2	deacetilación de lisina
STKc_GSK3	1	catalizador de transferencia del grupo gama fosforil
TCTP	1	controlador de proteínas de tumor
UBA_e1_C	1	Ubiquitinación
Ube1	2	Ubiquitinación
W2_eIF5C_like	2	factores de inicio de traducción

**Anexo 9:** Proteínas homologas obtenidas por medio de BLASTX de los ESTs obtenidos de la librería genética en el ensayo 3. Anexo 9: continua.

<b>Proteína Relacionada</b>	<b>Numero de Repeticiones</b>	<b>Organismo</b>
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 10-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
BAG family molecular chaperone regulator 6-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
calmodulin-binding receptor-like cytoplasmic kinase 3 isoform X1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
cation transport regulator-like protein 2	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
cingulin-like protein 1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
conserved oligomeric Golgi complex subunit 1-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
cryptochrome-1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
cyclin-T1-3-like isoform X1	2	Musa acuminata subsp. malaccensis
cysteine proteinase 1-like	3	Musa acuminata subsp. malaccensis
dnaJ protein homolog	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
fibropellin-1-like	2	Xenopus tropicalis
glycine dehydrogenase (decarboxylating), mitochondrial-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
lipase-like isoform X2	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
monodehydroascorbate reductase-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
monothiol glutaredoxin-S11-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
arginine/serine-rich coiled-coil protein 2 (LOC103977604), mRNA	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
NAC domain-containing protein 21/22-like	5	Musa acuminata subsp. malaccensis
peroxiredoxin Q, chloroplastic	2	Musa acuminata subsp. malaccensis
photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplastic	2	Musa acuminata subsp. malaccensis
pre-mRNA-splicing factor SLU7-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
probable cytochrome P450 4ac1	3	Bactrocera dorsalis
probable E3 ubiquitin-protein ligase HIP1 isoform X2	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
protein ALWAYS EARLY 3-like isoform X4	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
protein NLP3-like isoform X2	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
putative aconitate hydratase, cytoplasmic	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
scarecrow-like protein 1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
shaggy-related protein kinase alpha-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
SWI/SNF chromatin-remodeling complex subunit SNF5-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
translationally-controlled tumor protein homolog	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa-like	1	Musa acuminata subsp. malaccensis
<b>Proteína Relacionada</b>	<b>Numero de Repeticiones</b>	<b>Organismo</b>
ubiquitin-activating enzyme E1 2-like isoform X1	1	Musa acuminata subsp. malaccensis

uncharacterized protein LOC103984717	7	<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>
UPF0496 protein 4-like	1	<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>
CP47 protein	1	<i>Rapatea</i> sp. Chase 195
cytochrome c oxidase subunit 1 (mitochondrion)	1	<i>Schrenkiella parvula</i>
dinitrogenase reductase	1	bacteria
F1 ATPase beta subunit	1	<i>Corchorus capsularis</i>
hemagglutinin esterase	12	Infectious salmon anemia virus
hypothetical protein AMTR_s00103p00141530	1	<i>Amborella trichopoda</i>
hypothetical protein B456_012G044100	1	<i>Gossypium raimondii</i>
hypothetical protein BBAD15_m00022	3	<i>Beauveria bassiana</i> D1-5
hypothetical protein Ccrd_023064	1	<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>
hypothetical protein CISIN_1g029675mg	1	<i>Citrus sinensis</i>
hypothetical protein DCAR_001522	3	<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>
hypothetical protein M569_00360	1	<i>Genlisea aurea</i>
hypothetical protein MIMGU_mgv1a024202mg, partial	3	<i>Erythranthe guttata</i>
hypothetical protein MTR_3g035620	3	<i>Medicago truncatula</i>
hypothetical protein VITISV_009275	1	<i>Vitis vinifera</i>
MADS FLC-like protein 2	13	<i>Cichorium intybus</i>
manganese superoxide dismutase	1	<i>Taiwanofungus camphoratus</i>
matK	1	<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>
maturase K	3	<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>
MPBQ methyltransferase	1	<i>Triticum aestivum</i>
N-acetylglucosaminyltransferase	1	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ISLU256
NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 5	1	<i>Heliconia collinsiana</i>
nitrogenase reductase	4	bacteria
ORF124	3	<i>Pinus koraiensis</i>
photosystem I apoprotein A2	3	<i>Cenchrus americanus</i>
photosystem II protein Z	1	<i>Phalaenopsis aphrodite</i> subsp. <i>formosana</i>
predicted protein	4	<i>Nematostella vectensis</i>
protein TAR1	1	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
PsaB	1	<i>Lippia alba</i>
putative retinoic acid converting enzyme	13	<i>Hirudo medicinalis</i>
ribosomal protein S12	3	<i>Angiopteris evecta</i>
ribosomal protein S2	1	<i>Xiphidium caeruleum</i>
ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	2	<i>Ceroxylon echinulatum</i>
RNA polymerase beta subunit	1	<i>Musa acuminata</i>
Rpl14	1	<i>Pera bumeliifolia</i>
transposase IS630	48	<i>Listonella anguillarum</i> serovar O2

**Anexo 10:** Descripción de superfamilias y dominios encontrados en la librería genética obtenida en el ensayo 3. Anexo 10: continua.

<b>Familia/Dominio</b>	<b>Numero de Repeticiones</b>	<b>Función</b>
ANK	1	inhibición en ciclos celulares
Ank_4	1	Transportador PPi
atpB	1	actividad catalítica
ChaC	1	Catalizador de ácido PyroGlutamico
Cryptochrome_C	1	Fotoreceptores
Cyt_c_Oxidase_I	1	Cadena Respiratorio
DnaJ_C	1	Oligomerización y desnaturalización de polipéptidos
DUF3675	1	Anclaje de iones de Zinc
F1-ATPase_beta	1	funciones intracelulares
GcvP2	1	Catalizador
GRAS	1	Señalizador de Giberelinas
GRX_PICOT_like	1	Actividad REDOX
matK	4	Anclaje de ARN
MatK_N	4	Anclaje de ARN
NAM	1	Meristemal
ndhF	1	Cadena fotosintética
Peptidase_C1 PLN00053	1	antibióticos
	2	Envolvimiento de oxígeno en el complejo de Fotosistema II
PLN00070	1	Catalizador del isocitrate
PLN00223	1	cadena catalizadora
PLN02356	1	catalizador de reemplazamiento y eliminación de reacciones beta
PLN02414	2	metabolismo para energía
PLN02490	1	metilación
PLN02556	1	catalizador de reemplazamiento y eliminación de reacciones beta
psaB	1	fotosíntesis
psaJ	8	fotosíntesis
psbB	1	fotosíntesis
psbZ	2	fotosíntesis
PTZ00036	1	catalizador de glicógeno a glucosa
PTZ00037	1	Oligomerización y desnaturalización de polipéptidos
PTZ00203	1	anclaje de proteínas
Pyr_redox_2	1	oxidoreductasa
rbcL	1	Regulador en RUBISCO
Ribosomal_S12_like	2	Translocación en síntesis de proteína
RNAP_beta'_C	1	catalizador de transcripción de ADN-ARN

<b>Familia/Dominio</b>	<b>Numero de Repeticiones</b>	<b>Función</b>
rpoC2	1	catalizador de transcripción de ADN-ARN
rps16	1	anclaje de ARN
rps2	3	complejo de traducción
rpsB	1	complejo de traducción
rpsP	1	complejo de traducción
RuBisCO_large_I	2	Ciclo de Calvin
SMAP	2	deacetilación de lisina
STKc_GSK3	1	catalizador de transferencia del grupo gama fosforil
TCTP	1	controlador de proteínas de tumor
UBA_e1_C	1	Ubicuitinación
Ube1	2	Ubicuitinación
W2_eIF5C_like	2	factores de inicio de traducción