

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.**

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

“Identificación de Genes Candidatos de Resistencia a  
Sigatoka negra en Variedades de Banano y Plátano”

**TESIS DE GRADO**

Previa a la obtención del Título de:

**INGENIERO AGRÍCOLA Y BIOLÓGICO**

**Presentada por:**

Christian Gerardo Saavedra Gallo

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**AÑO**

2012

## **AGRADECIMIENTO**

Al personal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por ayudarme en la realización de este trabajo, especialmente al Doctor Efrén Santos, a la Doctora Esther Peralta, al Ingeniero Eduardo Sánchez, al Biólogo Christian Romero y a la Ingeniera Lisette Hidalgo.

## **DEDICATORIA**

A DIOS A MIS PADRES A MIS  
HERMANOS Y A MI ESPOSA POR  
HABERME AYUDADO EN EL  
TRANSCURSO DE MI CARRERA  
UNIVERSITARIA.

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



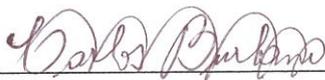
---

Ing. Gustavo Guerrero M.  
DECANO DE LA FIMCP  
PRESIDENTE



---

Dr. Efrén Santos O.  
DIRECTOR DE TESIS



---

Ing. Carlos Burbano V.  
VOCAL PRINCIPAL

## DECLARACIÓN EXPRESA

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

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



---

Christian Gerardo Saavedra Gallo

## RESUMEN

En Ecuador, 216.115 ha de banano y 110.693 ha de plátano fueron cosechadas en el 2009. Representan la actividad agrícola de mayor importancia para el país.

La Sigatoka negra producida por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* se ha convertido en la enfermedad más perjudicial para la producción actual de banano y plátano causando pérdidas de cosecha de un 50 % o más.

El control químico y la selección de plantas resistentes continúan siendo las estrategias mayormente usadas para combatir la Sigatoka negra. La ingeniería genética tiene el potencial para la generación de plantas con cierta resistencia/tolerancia al hongo.

Este estudio tiene como objetivo identificar genes candidatos de resistencia a la infección del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causante de la Sigatoka negra en variedades de banano y plátano procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Leuven, Bélgica) y del germoplasma del CIBE mediante el uso de iniciadores que amplifican estos genes candidatos de resistencia.

Se utilizaron 26 plántulas de banano y dos de plátano. Se realizó la extracción de ADN, PCR con iniciadores de genes de quitinasa y análogos de resistencia, corte con enzimas de restricción, RT-PCR y análisis bioinformático.

Se observó la presencia de genes de quitinasa y análogos de resistencias en algunas variedades. No hubo diferencia en el tamaño de las bandas cortadas por las enzimas de restricción. Hubo diferencia en las secuencias de ADN de 'Calcutta-4', 'Tuu Gia', 'Williams', 'Orito', 'Barraganete' y 'Dominico'. El gen de quitinasa se expresa en la variedad 'Calcutta-4' de forma basal y cuando se inocula con *M. fijiensis*.

Se recomienda confirmar la expresión de los genes encontrados en las variedades estudiadas en bioensayos con inoculaciones controladas de *M. fijiensis* y realizar pruebas de transformación genética para sobreexpresar los genes de quitinasa y análogos de resistencia y determinar si confieren resistencia a la Sigatoka negra en variedades susceptibles a la enfermedad.

# INDICE GENERAL

	<b>Págs.</b>
RESUMEN.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	IV
ABREVIATURAS.....	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
 INTRODUCCIÓN.....	 1

## CAPÍTULO 1 GENERALIDADES

<b>1. BANANO Y LA SIGATOKA NEGRA.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Importancia y origen del banano.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Origen y Distribución de la Enfermedad.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1. Importancia.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2. Interacción planta-patógeno.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.3. Ciclo de la Enfermedad y Epidemiología.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Control de la Sigatoka negra en el Ecuador.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3.1. Convencional.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.2. Orgánico.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4. Mejoramiento genético para resistencia a Sigatoka negra.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4.1. Mejoramiento convencional.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4.2. Mejoramiento por biotecnologías.....</b>	<b>33</b>

## CAPITULO 2

<b>2. GENES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES FUNGOSAS EN PLANTAS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1. Clases de genes de resistencia en plantas.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2. Metodologías para la Identificación de Genes de Resistencia.....</b>	<b>45</b>

## CAPITULO 3

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Material vegetal.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2. Caracterización molecular.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2.1. Extracción de ADN.....</b>	<b>54</b>
<b>3.2.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....</b>	<b>56</b>
<b>3.2.3. Determinación de presencia de genes candidatos de resistencia.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.4. Clonación de genes.....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.5. Análisis bioinformático de amplicones.....</b>	<b>64</b>
<b>3.2.6. Determinación de expresión génica de genes candidatos.....</b>	<b>65</b>

## CAPITULO 4

<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>67</b>
<b>4.1. Extracción de ADN en variedades de banano y plátano.....</b>	<b>68</b>
<b>4.2. Presencia de genes de quitinasa y análogos de resistencia         en variedades de banano y plátano.....</b>	<b>73</b>
<b>4.3. Expresión génica de genes candidatos de resistencia en         variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad.....</b>	<b>97</b>

## CAPITULO 5

<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	
<b>5.1. Conclusiones.....</b>	<b>99</b>
<b>5.2. Recomendaciones.....</b>	<b>100</b>

## APÉNDICES

## BIBLIOGRAFÍA

## ABREVIATURA

A.C.	Antes de Cristo.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ARN	Ácido Ribonucleico.
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador.
COS	Secuencias Conservadas Ortólogos.
ET	Etileno.
FAO	Organización de Agricultura y Alimentación.
FHIA	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola.
IITA	Instituto Internacional de Agricultura Tropical.
ISR	Resistencia Sistémica Inducida.
JA	Ácido Jasmónico.
LPT	Proteínas de Transferencia de Lípidos.
NBS-LRR	Sitio de unión de nucleótidos ricos en leucina repetidas.
PR	Relacionados con la patogénesis.
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa.
R-genes	Genes de resistencia.
RIP	Proteínas Inactivadoras de Ribosomas.
RGA	Genes Análogos de Resistencia.
RH	Reacción de Hipersensibilidad.
SAR	Resistencia Sistémica Adquirida.
SA	Ácido Salicílico.
UV	Ultra Violeta.

## SIMBOLOGÍA

g	gramo (Unidad de peso).
Ha	Hectárea (Unidad de área).
L	Litros (Unidad volumétrica).
M	Molar (Unidad de concentración).
min	minutos.
mL	mili Litro (Unidad volumétrica).
ng	nano gramo (Unidad de peso).
pb	pares de bases (Unidad de medida de ADN).
rpm	revoluciones por minuto.
s	segundos.
$\mu$ M	micro Molar (Unidad de concentración).
$\mu$ m	micro metro (Unidad de medida lineal).
$\mu$ L	micro Litro (Unidad volumétrica).
$\mu$ g	micro gramo (Unidad de peso).
UDO	Unidad de Densidad Óptica (Unidad óptica).

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 4.1. Presencia de iniciadores de actina 1F3 y R2.....	68
Figura 4.2. Presencia de iniciadores de actina 1F3 y R2.....	69
Figura 4.3. Control de calidad de ADN.....	70
Figura 4.4. Control de calidad de ADN.....	70
Figura 4.5. Control de calidad de ADN.....	71
Figura 4.6. Control de calidad de ADN.....	71
Figura 4.7. Control de calidad de ADN.....	72
Figura 4.8. Control de calidad de ADN.....	72
Figura 4.9. Control de calidad DE ADN.....	73
Figura 4.10. Presencia de genes de quitinasa CIBE 1 y CIBE 2 en ADN de banano y plátano.....	74
Figura 4.11. Presencia de genes de quitinasa CIBE 1 y CIBE 2 en ADN de banano y plátano.....	75
Figura 4.12. Presencia de genes de quitinasa CIBE 1 y CIBE 2 en ADN de banano y plátano.....	75
Figura 4.13. Presencia de genes de quitinasa CIBE 3 y CIBE 4 en ADN de banano y plátano.....	76
Figura 4.14. Presencia de genes de quitinasa CIBE 3 y CIBE 4 en ADN de banano y plátano.....	76
Figura 4.15. Presencia de genes de quitinasa CIBE 3 y CIBE 4 en ADN de banano y plátano.....	77
Figura 4.16. Presencia de genes de quitinasa CIBE 5 y CIBE 6 en ADN de banano y plátano.....	77
Figura 4.17. Presencia de genes de quitinasa CIBE 5 y CIBE 6 en ADN de banano y plátano.....	78
Figura 4.18. Presencia de genes de quitinasa CIBE 5 y CIBE 6 en ADN de banano y plátano.....	78
Figura 4.19. Presencia de genes de quitinasa CIBE 7 y CIBE 8 en ADN de banano y plátano.....	79

	<b>Pág.</b>
Figura 4.20. Presencia de genes de quitinasa CIBE 7 y CIBE 8 en ADN de banano y plátano.....	79
Figura 4.21. Presencia de genes de quitinasa CIBE 7 y CIBE 8 en ADN de banano y plátano.....	80
Figura 4.22. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes, tolerables y susceptibles a la enfermedad.....	82
Figura 4.23. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes, tolerables y susceptibles a la enfermedad.....	83
Figura 4.24. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes, tolerables y susceptibles a la enfermedad.....	83
Figura 4.25. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes, tolerables y susceptibles a la enfermedad.....	84
Figura 4.26. Agrupación de variedades de banano y plátano según la diferencia que existen en la secuencia del ADN con genes de quitinasa usando el programa Clustal Phylogenetic.....	91
Figura 4.27. Agrupación de variedades de banano y plátano según la diferencia que existen en la secuencia del ADN con genes análogos de resistencia usando el programa Clustal Phylogenetic.....	97
Figura 4.28. Expresión de gen de actina y quitinasa en 'Calcutta-4'.....	98

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 3.1. Accesiones y cultivares de banano y plátano analizados en el presente estudio. Se indica el nivel de resistencia a la Sigatoka negra y el nivel de ploidía de acuerdo a la información facilitada por el INIBAP.....	53
Tabla 3.2. Iniciadores de Actina en PCR. Características y longitud esperada del amplicón.....	57
Tabla 3.3. Iniciadores de genes de quitinasa en PCR. Características y longitud esperada del amplicón.....	59
Tabla 3.4. Iniciadores de genes análogos en PCR. Características y longitud esperada del amplicón.....	61
Tabla 3.5. Protocolo de PCR para determinación de expresión genética....	66
Tabla 4.1. Presencia de bandas con genes de quitinas o análogos de resistencia.....	81

# INTRODUCCIÓN

En Ecuador, 216.115 ha de banano y 110.693 ha de plátano fueron cosechadas en el 2009 (1).

La Sigatoka negra producida por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet es el principal problema fitosanitario que amenaza la producción de estas fuentes de alimentos y divisas, y es una enfermedad altamente destructiva que puede ocasionar pérdidas en el rendimiento entre un 50% y 100%, afectando de manera notoria la economía del productor (2).

En Ecuador, para controlar el ataque de la Sigatoka negra, se ha venido efectuando fumigaciones aéreas y terrestres con una amplia gama de fungicidas y como consecuencia los impactos sobre el medio ambiente y la salud de los trabajadores no son fáciles de corregir (2).

El control químico continúa siendo la estrategia mayormente usada para combatir la Sigatoka negra. La ingeniería genética tiene el potencial para la generación de plantas con cierta resistencia o tolerancia al hongo (2).

La identificación y aislamiento de genes de resistencia, sin duda tendrá un impacto importante en esta área.

Este estudio tiene como objetivo determinar la presencia de genes candidatos de resistencia a la infección del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causante de la Sigatoka negra en variedades de banano y plátano procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) y de la colección de germoplasma del CIBE mediante el uso de iniciadores que amplifican estos genes candidatos de resistencia. Lo que se espera obtener como resultado de esta investigación es conocer si en cada una de las variedades de banano y plátano que se vaya a investigar, están presentes genes candidatos de resistencia a Sigatoka negra, y determinar si se expresan en variedades resistentes o susceptibles a la enfermedad, como base para sus posibles usos en la generación de bananos y plátanos cisgénicos con resistencia a la Sigatoka negra.

# **CAPÍTULO 1 GENERALIDADES**

## **1. BANANO Y LA SIGATOKA NEGRA.**

El banano y el plátano son alimentos básicos que contribuyen a la seguridad alimentaria y productos de exportación que constituyen una fuente importante de ingresos. Las formas de su consumo varían ampliamente entre países, de acuerdo a los hábitos alimenticios. La posición estable pero frágil en que se encuentran los productores se debe a la amenaza de las enfermedades que atacan al cultivo a una velocidad cada vez mayor en todo el mundo (3).

La producción comercial de estos cultivos involucra varios aspectos a vencer, entre ellos los relacionados al combate de enfermedades, y entre estas la conocida como “Sigatoka negra”, cuya etiología la constituye un hongo denominado *Mycosphaerella fijiensis*. Dicha enfermedad cuando está presente, constituye uno de los principales problemas fitopatológicos de la producción de plátanos y bananos ya que por la seriedad de su incidencia ocasiona, bajos o ningún rendimiento y altos costos por las características de su combate (4).

### **1.1. Importancia y origen del banano.**

El plátano es una fruta tropical originaria del sudoeste asiático, perteneciente a la familia de las musáceas (es un híbrido triploide de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*). El plátano se produce a lo largo del trópico húmedo, concentrado fundamentalmente en África, Asia, América Latina y el Caribe. Según la FAO, el plátano se cultivaba en el sur de la India alrededor del siglo V A.C. De allí se distribuyó a Malasia, Madagascar, Japón y Samoa (3).

En el continente americano, este frutal se encuentra distribuido en la parte norte, centro y sur de América, en donde las condiciones ecológicas propician su desarrollo, siendo Brasil el máximo productor. Los países Latinoamericanos y del Caribe producen la mayor cantidad de los bananos y plátanos que entran en el comercio Internacional (5).

Como alimento es considerado uno de los cultivos más importantes en el mundo, ocupando este frutal el cuarto lugar en importancia, después del arroz, trigo y la leche (5).

Se estima que a nivel mundial los bananos y plátanos se cultivan en una superficie mayor de 4`843.595 hectáreas y que se produce alrededor de 95`595.965 toneladas de fruta (1), de los cuales un poco más de 10% es exportable. Los principales países exportadores de bananos son: Ecuador, Costa Rica, Colombia, Panamá, Guatemala, Honduras, Filipinas y México (5).

## 1.2. Origen y Distribución de la Enfermedad.

La Sigatoka negra, se describió como una enfermedad nueva en 1963, en las islas Fiji (6), donde en poco tiempo se diseminó desplazando a la Sigatoka amarilla, comportamiento que se presenta en forma similar en la mayoría de las regiones bananeras y plataneras del mundo. Aparentemente, se origino en Papua Nueva Guinea e islas Salomón, desde donde posteriormente y antes de 1927 se disperso a Taiwán, Fidji, Hawái, Filipinas y otras islas del Pacífico asiático. En Centroamérica se describió por primera vez en Honduras en 1972 y desde allí se diseminó por el resto de la región. En Suramérica se registró por primera vez en Colombia en 1981 (6).

La Sigatoka negra fue detectada en el Ecuador en febrero de 1987 al norte del país, en la provincia de Esmeraldas, para el año 1989 se la encontró en las provincias de los Ríos y de Guayas y finalmente en 1992 apareció en las bananeras de la provincia de El Oro, al sur del país. Por lo que a esta enfermedad le tomó 5 años en infectar todas las bananeras del Ecuador (7).

Esta enfermedad causa una reducción significativa en el área foliar efectiva resultando en pérdidas de cosecha de un 50 % o más (8).

También puede provocar la madurez de los frutos prematuros, lo que ocasiona un grave problema para la exportación (8).

En países que producen banano para la exportación como los de América Latina, la Sigatoka Negra se trata de controlar por medio de frecuentes aplicaciones de fungicidas. Esta práctica resulta muy costosa debido a que se hace por medio de avionetas, helicópteros u otros medios (8). Además de las consecuencias ambientales que eventualmente podría acarrear una mala aplicación.

#### **1.2.1. Importancia.**

La Sigatoka negra se ha convertido en la enfermedad más perjudicial para la producción actual de banano. Afecta al crecimiento y a la productividad de las plantas y es el motivo principal por el cual los exportadores rechazan la fruta (9).

El hongo causante de la enfermedad, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, reduce la fotosíntesis, así como el tamaño del fruto, e induce a una maduración prematura (9).

Bajo condiciones favorables, la necrosis de las hojas puede reducir los rendimientos de 35-50%, y muchos cultivares que son importantes y comúnmente sembrados son susceptibles (10). Anualmente, una plantación típica necesita de 12 - 28 fumigaciones, y estas aplicaciones de fungicidas pueden subir aproximadamente en un 30% los costos de producción.

En el Ecuador existen aproximadamente unas 216.115 ha de banano, ubicadas en la región Litoral o Costa, particularmente en las provincias de Los Ríos, Guayas y El Oro; unas con alta tecnología y otras de mediana a baja tecnología, infectadas con Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* var). La variabilidad del clima ha hecho que la Sigatoka negra tenga un comportamiento diverso (7).

En Ecuador, el control de la Sigatoka negra anualmente ocasiona un gasto de \$140.000.000 en las 216.115 ha de banano cultivadas (1).

### **1.2.2. Interacción planta-patógeno.**

En el caso de ataque de patógenos (hongos, bacterias, nematodos y virus), las plantas refuerzan sus barreras estructurales que impiden la entrada de los mismos (11) y activan respuestas de defensa enzimática y química que interfieren con el metabolismo del patógeno (12). En resumen, estas respuestas son la síntesis de especies reactivas de oxígeno y antibióticos de metabolitos secundarios (13), la lignificación de las paredes celulares y la activación de una amplia gama de genes, como proteínas de patogenicidad relacionadas (PR), que incluyen quitinasas (PR-3, 14) y defensinas vegetales (. PR-12, 15). Estos genes, que proporcionan la defensa basal, inhiben la propagación de patógenos después de la infección (16).

Mecanismos de defensa empleados aquí incluyen lignificación de la pared celular y el enriquecimiento (17) y la producción de fitoalexinas, así como los inhibidores de enzima que degradan la pared celular (17). Otros genes, incluyendo los genes de resistencia (R-genes) que están involucrados por los mecanismos de defensa en dependencia del reconocimiento (recognition-dependent) o receptor ligado (ligand-receptor), desencadenan una cadena de eventos de transducción de señal que resulta en la activación de varios mecanismos de defensa y detención del crecimiento de patógenos (16). Los patógenos avirulentos con frecuencia desencadenan la respuesta hipersensible (16) y la resistencia sistémica adquirida (SAR) o resistencia sistémica inducida (ISR, 18).

La señalización de defensa incluye también al ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) de las hormonas de las plantas (18).

Las vías dependientes del ácido salicílico (SA-dependent) son inducidos por la invasión biotrófica mientras que la invasión necrotrófica o ataques de heridas son más a menudo asociados con las vías dependientes del etileno o ácido jasmónico (ET-JA-dependent). Por otra parte, la vía de señalización SA induce SAR mientras que la vía de señalización ET-JA induce en ISR. Es importante tener en cuenta que las vías de defensa SA y ET-JA-dependent inducen diferentes mecanismos de resistencia involucrando componentes diferentes, y las dos vías por lo general tienen interferencia negativa entre sí (18). Sin embargo, tanto SA-dependent y ET-JA-dependent inducen SAR o ISR, respectivamente, implicando una proteína reguladora NPR1. A la inducción de SAR o ISR, NPR1 activa la expresión génica PR-1 por interacción física con una subclase de leucina básica de los factores de transcripción de proteínas que se unen a las secuencias del promotor de genes necesarios para SA o ET-JA-relacionados a la síntesis de proteínas PR (18).

Tales respuestas de defensa son con frecuencia aplicadas después de que una planta hospedera no ha podido contener la invasión del agente patógeno, el crecimiento y multiplicación dentro de sus células (18).

La clasificación de los genotipos de *Musa spp.* con relación a su resistencia a la enfermedad ha sido el resultado de la caracterización de las interacciones planta – patógeno. Esta interacción inicia cuando las ascosporas o conidias de *M. fijiensis* llegan e inician la penetración a los espacios intercelulares del parénquima de la hoja, a través de las estomas (19). De acuerdo al resultado de esta interacción, los cultivares se han clasificados en tres categorías: los altamente resistentes que bloquean tempranamente la infección (interacciones incompatibles), los parcialmente resistentes que desarrollan los síntomas lentamente (interacciones compatibles) y los susceptibles que desarrollan los síntomas rápidamente (interacciones compatibles) (20).

La resistencia de algunas especies de *Musa* a *M. fijiensis* parece ser relacionada más a la postinfección, es decir, la planta activa un mecanismo de defensa, manifestado por la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis (21) y algunas fitoalexinas (22), así como cambios de en la estructura de sustancias preformadas (23). El conocimiento de la información genética sobre la herencia natural de la resistencia de musáceas a *M. Fijiensis*, es importante para poder desarrollar estrategias de mejora genética de la planta, orientadas hacia la resistencia de la enfermedad (20).

### **1.2.3. Ciclo de la Enfermedad y Epidemiología.**

La duración del ciclo de vida del agente causal de la Sigatoka negra, está influenciada por las condiciones climáticas, clase de hospedero, variabilidad del patógeno, sistemas de explotación y manejo agronómico de las plantaciones (24).

El ciclo de vida del hongo se inicia con la germinación de las esporas, que después de haber sido liberadas y dispersadas por la acción del agua y el viento, se depositan sobre la superficie de las hojas de la planta. Para que ocurran los procesos de germinación y penetración es indispensable la presencia de agua libre sobre las hojas. Cuando esta condición se da, las esporas germinan en menos de dos horas, dando lugar a los tubos germinativos rectos que se alargan y ramifican en busca de las estomas (poros de la hoja) por donde penetran en menos de una semana (24).

Bajo condiciones ambientales óptimas para el hongo, el periodo de incubación (tiempo transcurrido entre la germinación de las esporas y la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad) dura 17 días en banano y 27 días en plátano (24), mientras que el periodo de latencia o sea hasta la aparición de conidióforos y conidios, que se forman en el estado de estría, ocurre 28 días luego de la infección en banano y 34 días después en plátano (25).

La culminación o finalización del ciclo de vida, que ocurre con la liberación de las primeras ascosporas, puede presentarse 49 días después de la infección en banano y 64 días después en plátano (25).

Durante los meses de verano los periodos de incubación y latencia, la transición de la infección a cada uno de los signos y la formación de peritecios presentan en promedio una mayor duración, que se refleja en un retardo en la manifestación de signos y por ende en la formación de conidios, peritecios y ascosporas. Las condiciones ambientales, el estado fisiológico y grado de nutrición de la planta, la virulencia del patógeno junto con la concentración de esporas o conidias, son determinantes en la intensidad de infección y la evolución a cada uno de los estadios de desarrollo de la enfermedad. Es así como se pueden encontrar pizcas de "Raya negra" cinco días después de inocular con una concentración muy fuerte de esporas o alargamiento de los ciclos de enfermedad por efecto de condiciones ambientales adversas (25).

En ausencia de prácticas de manejo, se asume que la iniciación del ciclo de vida del patógeno es realizada en cada una de las hojas de la planta desde el momento de su emisión (24).

La curva de infección de la enfermedad en condiciones ambientales, presenta una variación estacional a través del año, con picos de máxima infección durante los meses de junio a diciembre y mínimos durante marzo a mayo. Estas variaciones son efecto de las lluvias que son constantes durante nueve meses del año, entre abril y diciembre y llegan a su máximo decrecimiento entre enero y marzo. Los desfases ocurridos entre las dos curvas son el resultado de los periodos infectivos y de incubación. Es importante hacer resaltar que sin necesidad de efectuar un programa de control, por efectos ambientales ocurre una disminución en la infección durante una época del año, lo cual puede ser de gran utilidad para el manejo del patógeno, con un menor número de aplicaciones (25).

Una observación más detallada del comportamiento del patógeno en relación con las condiciones ambientales, muestra que un mayor cúmulo de precipitaciones induce la liberación de esporas y las lluvias continuas y mejor distribuidas, hacen que las hojas necrosadas con ascarpos del hongo, lleguen a grados de turgencia suficiente como para que haya liberación de ascosporas al ambiente, reflejándose en un incremento apreciable de su cantidad, que según lo observado coincide con el inicio de las lluvias (25).

La tasa de emisión de hojas, una nueva cada siete días, en una época como el verano de cuatro meses, induce en una plantas “soltera” la aparición de diez hojas más, o sea la renovación total del follaje libre de infección por una ineficiente tasa de infección por condiciones ambientales adversas. Sin embargo, una sola liberación de esporas por efecto de la congruencia de factores ambientales en un solo momento al inicio del invierno, hace que se pierda en una semana todo el trabajo que hizo el ambiente en cuatro meses (25).

Por eso ésta es exactamente la base del manejo epidemiológico, una sola aplicación en este momento mantendría la hoja más joven manchada alrededor de la número nueve y por ende el nivel de infección en límites sorprendentes bajos (25).

El desarrollo de la enfermedad bajo las condiciones ambientales, tiene un modelo simétrico de progreso, el cual lógicamente comienza, por efecto del verano, con niveles de infección cercanos a cero durante esta época del año. Posteriormente, con una alta cantidad del inóculo en el ambiente, al inicio de las lluvias, se produce un progreso desarrollo de la infección, a través del cual se pierde el 100% del área foliar sana (25).

Tomando como base los factores anteriores, se infiere que la tasa de emisión de hojas sanas está afectada por la tasa de crecimiento del hospedero, y ésta, que es ligeramente más lenta durante el invierno, se acelera en el verano por mayor luminosidad (25).

Las hojas sanas, al ser infectadas, pasan por un estado de latencia y posteriormente forman las famosas pizcas del hongo, que con el tiempo evolucionan a estrías y posteriormente a manchas que se generalizan como área foliar infectada, considerada dentro del sistema tradicional con escalas evaluativas. Estas hojas enfermas son la fuente de inóculo inicial, a partir del cual se reinicia el proceso de infección del patógeno en nuevas hojas, plantas o áreas ecológicas (25).

Aunque el orden con el cual se presentan aquí no significa jerarquía o preponderancia en su efecto, los factores que inciden sobre el progreso de la enfermedad son:

1. Ambientales: la temperatura que afecta la humedad relativa, la humedad relativa en si y la precipitación (25).
2. El hospedero: altera la evolución del patógeno por su tasa de emisión de hojas, el crecimiento foliar, la densidad de cultivo y los signos generados por el tipo de genotipos atacados o por los programas de control emprendidos (25).

3. El patógeno: por su nivel de incidencia, grado de severidad del ataque y densidad de inóculo caído sobre las hojas (25).

### **1.3. Control de la Sigatoka negra en el Ecuador.**

El manejo de la enfermedad se basa en la implementación de medidas culturales, drenajes para reducir la humedad interna de la plantación, una adecuada densidad de plantas, saneamiento de hojas enfermas, nutrición equilibrada para garantizar una rápida salida de hojas y potenciar las defensas naturales de la planta (26).

El adecuado sistema de cosecha, el uso de clones con resistencia parcial, donde estos son aceptados, y el empleo de agroquímicos y compuestos de origen natural para el control son también usados para un mejor manejo de la enfermedad (26).

La implementación de programas de manejo eficientes requiere de tres tipos de informaciones básicas: 1) climáticas: particularmente cantidad, frecuencia de la lluvia y duración de la humectación de las hojas, que permite valorar la evolución epidemiológica futura (27); 2) biológicas: velocidad o ritmo de salidas de hojas, hojas más jóvenes con síntomas y manchas necróticas; severidad en la floración (28); velocidad de la evolución de la enfermedad (29); 3) sensibilidad de las poblaciones a los principales fungicidas utilizados.

### **1.3.1. Convencional.**

El uso de fungicidas para la protección contra la enfermedad recibe una atención importante, porque en áreas con una adecuada pluviometría para la producción bananera de clones susceptibles las medidas no químicas no permiten alcanzar un control satisfactorio de la enfermedad (30).

El manejo químico de la Sigatoka negra se ha llevado a cabo con el uso de fungicidas protectores y sistémicos en suspensión acuosa, en emulsiones de aceite y agua, o en mezcla directamente con aceite mineral solo, con activadores de mecanismos de resistencia del hospedante, y últimamente mediante el uso de compuestos relacionados con la nutrición, tanto de origen químico como naturales, con efecto sobre la fisiología de la planta y el desarrollo de la enfermedad (31).

Haciendo un control preventivo de la enfermedad; es decir, aplicando los fungicidas sistémicos antes de que comiencen las lluvias, se ha logrado que funcionen con todo su potencial biológico en la época lluviosa; situación que no ocurre cuando se espera primero que aparezcan síntomas severos con lesiones en las hojas y recién allí se decide a aplicarlos (7). Esto ha permitido, reducir año tras año el número de ciclos aplicados y consecuentemente los costos de control; así como también, ser amigables con el ambiente (7).

### 1.3.2. Orgánico.

La agricultura orgánica es un sistema de producción holística en donde se enfatiza el uso de métodos agronómicos, mecánicos y biológicos para aumentar el ecosistema de las zonas de producción (32). Hay mucha evidencia de que las enmiendas orgánicas reducen el ataque de enfermedades por la reducción de patógenos.

Es decir, en el caso de patógenos fungosos, se ha determinado que las enmiendas orgánicas poseen un efecto fungicida y/o fungo-estático. Asimismo, se ha probado su efecto en el control de *Phytophthora* en diferentes cultivos (33). En tomate (34), las enmiendas orgánicas han causado una reducción de la incidencia de enfermedades.

Además, de un efecto directo en patógenos, las enmiendas orgánicas pueden inducir una respuesta de resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) en muchos cultivos; sin embargo, el proceso metabólico en las plantas no está definido claramente y no todas las enmiendas orgánicas activan este sistema de defensa, por lo que más estudios son necesarios (35).

Prácticas culturales fuertemente relacionadas con la Sigatoka negra son fundamentales para el buen manejo de la enfermedad, tales como oportuna poda fitosanitaria, buen drenaje, adecuada nutrición, apropiada población/distribución y la eliminación de hojas (36).

Una alternativa viable es mediante el uso de enmiendas orgánicas como el minicomposteo, el cual consiste en hacer montones con todos los desechos de las plantas de banano dentro de la plantación (37).

La hojarasca, porciones de hojas que son cortadas y las plantas eliminadas después de la cosecha son apiladas en montones para provocar una rápida degradación y sirvan como aporte de nutrimentos y materia orgánica. Todos los tejidos (hojas y pseudotallo) deben ser cortados para lograr una eficiente descomposición. Los montones de desechos deben hacerse entre las calles a una distancia de 5 a 6 metros (37).

El uso de biofertilizantes tratados con bacterias del genero *Azospirillum* y hongos micorrízicos en el cultivo del banano produce plantas con mayor desarrollo y emisión de hojas, lo que ayuda a una mayor resistencia de las plantas al daño de Sigatoka negra (37).

#### **1.4. Mejoramiento genético para resistencia a Sigatoka negra.**

La incorporación de genes de resistencia es uno de los mayores desafíos para los mejoradores durante el desarrollo de nuevos cultivares. Tradicionalmente se ha llevado a cabo a través de métodos convencionales de mejoramiento, que involucran selección y evaluación de grandes poblaciones derivadas de cruzamientos entre materiales susceptibles y resistentes y la posterior selección bajo condiciones propicias para la enfermedad (38).

Si bien estos métodos convencionales han resultado exitosos en muchos casos, son lentos y laboriosos, ya que involucran cruza, retrocruza y selección, siendo además difícil seguir la evolución de nuevas razas virulentas de los patógenos. Esto ha llevado a un uso masivo de agroquímicos a pesar de su alto costo y su alto impacto ambiental (38). El mejoramiento de banano por métodos convencionales es dificultoso debido a altos niveles de esterilidad en los gametos masculinos y femeninos, a la poliploidía existente en la mayoría de los cultivares y a los largos períodos del ciclo de cultivo (39).

Además, un programa por mejoramiento convencional puede proporcionar pocos híbridos. Los pocos híbridos seleccionados son de alto rendimiento y resistentes a enfermedades pero usualmente pierden otras características deseadas a nivel de postcosecha como vida verde y maduración de la pulpa llevando de esta manera al desuso de estos híbridos mejorados para la producción a gran escala (39). Asimismo los largos ciclos del cultivo, además de la poca producción de semillas y su difícil germinación en la producción de híbridos hacen del mejoramiento convencional en banano un método largo y complicado.

La biotecnología y la biología molecular ofrecen nuevas herramientas a los mejoradores, aumentando las posibilidades y la eficiencia en la obtención de variabilidad genética y en la selección de caracteres deseables, brindando además alternativas viables para identificar, seleccionar y transferir genes de resistencia (38).

A través de la ingeniería genética es posible insertar solo los genes necesarios para proporcionar ciertas características deseadas como resistencia a enfermedades, por lo que las propiedades organolépticas o características de postcosecha se mantendrían como en el cultivar original.

El cultivo *in vitro* fue una de las primeras herramientas de la biotecnología utilizadas en la búsqueda de resistencia a enfermedades. Desde sus distintas alternativas brinda soluciones para sortear barreras en los cruzamientos, colaborando además en la selección de genotipos resistentes (38).

La introducción en los bananos y plátanos de la resistencia a la Sigatoka negra en los programas clásicos de mejoramiento se basa en la utilización de la resistencia encontrada en especies silvestres de *Musa* como *M. acuminata* ssp. *burmannica*, ssp. *malaccensis* y ssp. *siamea*, y en cultivares diploides como 'Paka' (AA) y 'Pisang lilin' (AA). Con los híbridos obtenidos se realizan pruebas en el campo en lugares seleccionados de diferentes regiones del mundo (40).

Para poder conferir más eficacia al programa de mejoramiento genético de los bananos por medio de la introducción de una resistencia duradera, es importante conocer el grado y la distribución de la variabilidad de los patógenos (40).

#### **1.4.1. Mejoramiento convencional.**

Es posible encontrar genes de resistencia en muchas de las especies cultivadas o en especies muy cercanas filogenéticamente y transferirlos por cruzamientos convencionales a especies susceptibles (41).

Dos elementos fueron determinantes en el desarrollo de la estrategia 3x/2x: la puesta en evidencia de una fertilidad femenina residual en algunos cultivares triploides por una parte y, por otra, la observación de una proporción importante de tetraploides en sus descendientes gracias a la formación de gametos triploides no reducidos que permiten conservar la totalidad del genoma de los triploides (41).

Esta estrategia fue ampliamente explotada para intentar crear híbridos tetraploides resistentes a las enfermedades y de buen valor agronómico polinizando triploides sensibles con diploides masculinos fértiles y resistentes (41).

Dentro del marco de la estrategia  $4x/2x$ , se crean híbridos triploides mediante hibridación entre un progenitor diploide y otro tetraploide, previamente obtenido por duplicación cromosómica con colchicina de un antepasado diploide o de un híbrido diploide mejorado (41).

Esta estrategia imita el proceso natural de evolución de los bananos, ya que se supone que los cultivares triploides naturales proceden de antepasados diploides con una producción accidental de gametos no reducidos en uno de los progenitores diploides durante la hibridación (41).

Al contrario de la estrategia 3x/2x, la 4x/2x no intenta mejorar las variedades existentes sino más bien crear nuevas variedades mejoradas, próximas de los modelos escogidos, a partir de variedades ancestrales (41).

Dichos híbridos deben, por tanto, reunir el conjunto de las características clásicas de los bananos que están destinados al mejoramiento y, además, los caracteres mejorados que persigue la estrategia (41).

Los ejemplos más conocidos dentro de los híbridos tetraploides de tipo postre de la FHIA (FUNDACION HONDUREÑA DE INVESTIGACION AGRICOLA) provienen de cruzamientos entre mutantes enanos 'Gross Michell' y 'Prata', y diploides mejorados resistentes a las enfermedades de la raya negra de la hoja (41).

Dentro de los bananos de cocción, destacan el CRBP-39 del CARBAP y el FHIA-21 (híbridos de plátano) y el BITA 3 del IITA (INSTITUTO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL) resistentes todos ellos a la enfermedad de la raya negra de la hoja y que están introduciéndose o ya se cultivan en algunos países (41).

Contrariamente a los triploides, los diploides son muy fértiles y contienen una considerable diversidad genética; pueden ser silvestres, semisilvestres o partenocárpicas, presentando frecuentemente una o más fuentes de resistencia (o de tolerancia) a enfermedades y plagas, así como diversas cualidades organolépticas. Tienen diferentes niveles de heterocigosidad y, algunos de ellos, son antepasados de los cultivares triploides destinados al mejoramiento (41).

La gran diversidad genética de los diploides colectados en el sudeste asiático y en India permitió seleccionar diploides silvestres, semipartenocárpicos y partenocárpicos, como 'Calcutta 4' (*Musa acuminata* ssp. burmanicoïdes) y 'Pisang lilin' (diploide partenocárpico fértil con fruto sin semillas). Estos últimos se utilizaron para mejorar los cultivares triploides pero también sirvieron de base para el desarrollo de progenitores diploides mejorados (41).

#### **1.4.2. Mejoramiento por biotecnologías.**

Los avances en biotecnología permiten el mejoramiento genético de cultivos a través de la manipulación directa de genes de interés comercial sin afectar otras características de los cultivos (42).

La transformación genética mediante el bombardeo de partículas ó mediada por *Agrobacterium* es una alternativa muy prometedora para el desarrollo de plantas resistentes a esta enfermedad (43).

El aislamiento de genes de resistencia y el desarrollo de plantas transgénicas ofrece expectativas para resolver estos problemas en musáceas (42).

El uso de estas tecnologías en musáceas es bien justificado dado que el mejoramiento genético convencional es limitado por la alta esterilidad y niveles de ploidía de los cultivares comerciales (44). La transformación genética es una alternativa a la mejora convencional de banano en donde genes que confieren características de resistencia a enfermedades y/o tolerancia a estrés abióticos en las plantas son insertados en el genoma. La mejora genética por medios convencionales no es posible en los cultivares comerciales del subgrupo Cavendish debido a la casi esterilidad total del gameto femenino (45), incluyendo el cultivar 'Williams' (genotipo AAA), que es uno de los principales cultivares usados en la producción de banano tipo postre en el Ecuador (45).

Adicionalmente, la inflorescencia masculina de muchos cultivares del subgrupo de los plátanos (genotipo AAB) está completamente ausente o gradualmente degenerada (45). Por consiguiente la introducción de características de resistencia mediante transformación genética tiene potencial para ser una técnica importante en el mejoramiento del banano (45).

Una de las ventajas de la transformación genética en banano es que al insertar genes en el genoma de la planta se asegura que el transgen va a estar confinado en las plantas transformadas ya que las plantas de banano son estériles por lo que no habría fuga del transgen a especies silvestres o al medio ambiente. La fuga del transgen al medio ambiente es una de los riesgos sugeridos en la producción de transgénicos (46).

# **CAPÍTULO 2**

## **2. GENES DE RESISTENCIA A ENFERMEDADES FUNGOSAS EN PLANTAS.**

Una de las alternativas biotecnológicas más promisorias para obtener resistencia a enfermedades es la incorporación de genes de resistencia mediante tecnología génica (47).

Como resultado de los estudios tendientes a la identificación, clonación y caracterización de genes involucrados en la resistencia a enfermedades han sido identificadas muchos mecanismos que las plantas utilizan para responder a la infección de patógenos, lográndose avances en el conocimiento de los genes que participan en estas respuestas (47).

La identificación de estos genes permitió la evaluación de su rol específico y su forma de activación mediante el empleo de plantas transgénicas (47).

## **2.1. Clases de genes de resistencia en plantas.**

La selección de genes de resistencia para ser introducidos en plantas por tecnología génica se basa, en parte, en la evaluación de la toxicidad de productos génicos sobre el crecimiento y desarrollo de los patógenos in vitro y del rol del gen en las respuestas de resistencia (48).

Muchos productos génicos pertenecen al grupo de las proteínas relacionadas a la patogénesis, mientras que otras pertenecen a las vías biosintéticas de las fitoalexinas (compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular producto del metabolismo secundario) o fortalecen las defensas estructurales (por ejemplo fortificación de la pared celular) (48).

Algunas respuestas normales de resistencia son relativamente lentas, detectándose, en algunos casos la expresión 48 horas luego de la infección (48).

Otros genes interesantes son aquellos que participan en las vías de inducción de los mecanismos naturales de resistencia (49) y los genes análogos de resistencia (RGA por sus siglas en inglés). Para esto, iniciadores degenerados que se anillan a regiones o motivos conservados se utiliza para la amplificación de RGA de diversos *Taxas* de planta como Soya (50), *A. thaliana* (51), arroz (52), maní (53) y banano (54).

Recientemente, la clonación de numerosos genes R (de resistencia) ha precipitado el interés en el uso de estos genes para obtener resistencias de amplio espectro. Las principales estrategias de control de enfermedades fúngicas mediante el uso de plantas transgénicas pueden ser agrupadas en cinco categorías (49):

- Expresión de productos génicos que son directamente tóxicos para los patógenos o que reducen su crecimiento. Incluyen proteínas relacionadas a la patogénesis (proteínas PR), como enzimas hidrolíticas (quitinasas, 1,3- $\beta$ -glucanasas), proteínas antifúngicas (osmotinas y taumatinas), péptidos antimicrobianos (tioninas, defensinas, lectinas), proteínas de transferencia de lípidos (LPT), proteínas inactivadoras de ribosomas 28S rRNA fúngicos (RIP) y fitoalexinas (49).
- Expresión de productos génicos que destruyen o neutralizan componentes de ataque del patógeno. Por ejemplo: inhibidores de poligalacturonasas (enzimas que degradan algunos componentes de la pared celular vegetal), ácido oxálico o lipasas (49).

- Expresión de productos génicos que mejoran las defensas estructurales de la planta. Consiste en la elevación de los niveles de ligninas y peroxidasas asociadas a la pared celular (49).
- Expresión de productos génicos que participan en las vías de señales que regulan las defensas. Incluyen la producción de elicitores específicos, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido salicílico o etileno (49).
- Expresión de productos de genes de resistencia (genes R). Participan en la reacción de hipersensibilidad y en la interacción con factores de avirulencia (49).

La estrategia más ampliamente utilizada es la sobreexpresión de enzimas hidrolíticas tales como 1,3- $\beta$ -glucanasas o quitinasas, que degradan la pared celular de hongos y han demostrado tener actividad antifúngica in vitro. Con la expresión de diferentes tipos de quitinasas en varias especies vegetales se ha logrado reducir el tamaño, el número y el desarrollo de lesiones causadas por varios hongos patógenos, algunos de amplio rango de hospedadores, como por ejemplo *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (55).

Las diferentes quitinasas presentan variación en características tales como especificidad de sustrato, pH óptimo y localización celular, lo cual trae aparejadas diferencias en su actividad antifúngica (55). También son capaces de inhibir el crecimiento del patógeno por lisis a través de sus hifas (56). Por lo tanto, los genes que codifican quitinasas son candidatos atractivos para mejorar la resistencia a enfermedades. Sobre la base de la actividad antifúngica de quitinasas in vitro e in planta, los genes que codifican quitinasas se han clonado y expresado en diferentes plantas (57).

Resistencia basada en genes quitinasa se ha demostrado en varios cultivos como el tabaco (58), *Brassica napus* (59) y arroz (60). Se ha informado de que las plantas transgénicas de tabaco que expresan constitutivamente un gen de quitinasa de frijol mostraron una mayor resistencia al hongo, *Rhizoctonia solani* (61).

Se ha informado de que otras PR- proteínas también muestran patrones de resistencia similares, suprimen el crecimiento de hongos, pero no por completo impiden la invasión del patógeno que ataca en las células de la planta huésped (57).

Los resultados obtenidos utilizando 1,3- $\beta$  -glucanasas son similares a los de quitinasas. La expresión combinada de ambas enzimas en varias especies ha revelado un comportamiento mucho más efectivo en la prevención del desarrollo de varias enfermedades que la expresión de una sola de ellas. Lo mismo sucede con otras proteínas PR con actividad antifúngica in vitro, tales como osmotina y taumatina (TLP), que en plantas transgénicas muestran una disminución de los daños causados por enfermedad, pero los resultados más alentadores aparecen cuando se expresan en combinación con quitinasas y 1,3-b- glucanasas (62).

Como regla general, el uso de estrategias de ingeniería genética que involucren la expresión de dos o más productos de genes antifúngicos en un determinado cultivo debería proveer un control de la enfermedad más efectivo y de más amplio espectro que el uso de estrategias con un solo gen (62).

Las defensinas y tioninas son péptidos de bajo peso molecular, ricos en cisteína, que poseen actividad antimicrobiana. La sobreexpresión de estas proteínas en plantas transgénicas reduce el desarrollo de varios patógenos como *Fusarium* y *Alternaria* y confiere resistencia a *Verticillium* en papa en condiciones a campo. También se han desarrollado plantas transgénicas que expresan pequeños péptidos antimicrobianos sintéticos (10-20 aminoácidos) que pueden afectar a las hifas, a la pared celular o aumentar la permeabilidad de las membranas celulares fúngicas (63).

La habilidad para crear recombinantes sintéticos o variantes combinadas de péptidos ofrece nuevas oportunidades para lograr resistencia a un amplio rango de patógenos de manera simultánea, siendo alternativas promisorias para mejorar la eficacia de las plantas transgénicas en el futuro (63).

Las vías de señales que coordinan las respuestas de defensa en las plantas, que incluyen la reacción de hipersensibilidad (RH), la producción de proteínas PR y de fitoalexinas, pueden ser activadas por moléculas llamadas elicitores. La inducción de RH y necrosis, que resulta en la activación de respuestas de defensa, podría resultar en una inducción de resistencia a un amplio espectro de enfermedades. Mediante el uso de plantas transgénicas se han disectado genéticamente muchas de estas vías, identificándose muchos de los compuestos intervinientes en las respuestas de defensa a patógenos. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) inhibe el crecimiento de patógenos y activa ciertas vías de transmisión de señales que inducen respuestas de defensa. Otros activadores de defensas son el ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico (64).

La manipulación de los niveles de ácido salicílico en plantas transgénicas tiene un gran potencial para mejorar la resistencia a enfermedades, ya que no sólo inducen la expresión de proteínas PR, sino también la de otros productos de defensa, los cuales, en conjunto, han demostrado tener una interacción sinérgica y conferir elevados niveles de resistencia (64).

## **2.2. Metodologías para la Identificación de Genes de Resistencia.**

Dada la baja diversidad genética existente en cultivares comerciales de Musa, la rápida propagación de hongos patógenos, junto con el lento progreso en el descubrimiento de genes de Musa, las secuencias conservadas ortólogos (COS) son enfocadas hacia el descubrimiento de R-gen (genes de resistencias por sus siglas en ingles) para proporcionar oportunidades potenciales para el mejoramiento genético a través de selección asistida por marcadores, mejoramiento genético y la ingeniería genética (65).

La selección de genotipos resistentes se basa en la observación de la respuesta de genotipos individuales en la población de plantas ante la presencia del patógeno (65).

La selección *in vitro* se basa en exponer plantas, órganos, tejidos o células vegetales a patógenos o sus metabolitos simulando la interacción hospedador-patógena que tiene lugar en la naturaleza (66).

Esta técnica permite estandarizar la evaluación, haciéndola repetible y confiable, con la ventaja adicional de que en un espacio reducido y en un corto período se puede determinar la resistencia o tolerancia de gran cantidad de individuos (66).

Diferentes técnicas *in vitro* pueden ser explotadas para seleccionar o inducir variantes con mayor resistencia a enfermedades o para establecer modelos de estudio de interacciones planta-patógeno. Sin embargo, la elección de la estrategia experimental depende del sistema hospedador-patógeno considerado. Las principales variables a tener en cuenta son (67):

- La naturaleza y complejidad de las técnicas de cultivo *in vitro* requeridas (cultivo de embriones, regeneración de plantas desde suspensiones celulares, callos, etc.) (67).
- El nivel en que se realiza la selección (*in vitro* o en plantas regeneradas luego de realizar manipulaciones *in vitro*) (67).
- Los agentes utilizados para la selección de resistencia (el patógeno mismo, filtrados, toxinas específicas o toxinas de otro patógeno muy relacionado, agentes químicos, etc.) (67).
- El origen de la nueva resistencia buscada (recuperación de variación existente, cambios espontáneos, mutagénesis, etc.) (67).

Otra alternativa para la selección de materiales resistentes es usar como presión de selección enzimas pectolíticas, cuando éstas cumplen un rol importante en la patogénesis, como es el caso de los patógenos que producen la maceración de los tejidos que atacan (67). Mediante aproximaciones de genómica funcional, se plantea la utilización de microarreglos y técnicas de proteómica para la identificación de nuevos genes candidatos y estudiar así la base genética de la resistencia a enfermedades infecciosas (68), principalmente en el caso de genomas de plantas ya secuenciado.

Sin embargo, en plantas como banano, donde no existe genoma secuenciado en su totalidad, o no están disponibles para la comunidad científica en general otras alternativas pueden ser más útiles. Entre una de ellas es el de buscar genes análogos de resistencia (RGA por sus siglas en ingles) (54).

Muchos RGAs son filogenéticamente relacionados con los conocidos R-genes, y un número de estudios han demostrado mapas homólogos a los loci R-gen (50, 51), proporcionando evidencia de que tales regiones genómicas probablemente codifiquen para resistencia. En Musa, los avances en la caracterización de RGA se iniciaron recientemente, con sólo nueve secuencias de proteínas NBS-LRR como resistencia de la enfermedad, actualmente depositado en el banco de gen (54).

Un número de no-TIR RGAs NBS se han ampliado en las poblaciones silvestres de *M. acuminata* y *M. balbisiana*, así como en las especies cultivadas Zhongshandajiao, Fenjiao y Williams (69).

Otros grupos han descrito ortología Cf. en variedades criollas como Zebrina GF (70), y RGA Pto. de la familia de *M. acuminata* cv, Tuu Gia (71). Caracterización de NBS RGAs también ha sido recientemente ampliada a las especies de *Musa ornata* M., *schizocarpa* M. *textilis* M., y *M. velutina* (72).

Los genes candidatos a resistencia a Sigatoka negra identificados en banano se pueden utilizar para introducirlos junto con promotores y terminadores de banano para producir bananos transformados genéticamente con secuencias de ADN de la misma especie por lo que pudieran considerarse como bananos cisgénicos (la introducción de genes en una planta, con sus promotores originales, de una planta compatible de cruzamiento o de la misma planta) y no transgénicos (37, 38).

De esta manera tendrán una mayor aceptación para producción y consumo a nivel local e internacional ya que equivaldrían a plantas mejoradas por medios convencionales (híbridos) ya que los genes insertados serían de la misma especie.

La producción de bananos modificados genéticamente con genes de la misma especie (incluyendo promotores y terminadores) es la estrategia seguida por muchos laboratorios a nivel mundial en los últimos años ya que (i) tendrían una mayor aceptación para consumo por parte del público, (ii) se evitaría el uso de secuencias de promotores o genes que son usadas intensivamente en la producción de plantas transgénicas y que están protegidas por patentes, y (iii) se obtendría una mayor estabilidad y función de las secuencias insertadas. Ya se han identificado y aislado promotores de banano (28) y se van a utilizar estas secuencias en la transformación genética de 'Williams' para determinar su actividad.

## CAPÍTULO 3

### 3. MATERIALES Y METODOS.

La presente investigación fue orientada a la validación de la siguiente hipótesis:

“En la diversidad genética de los genotipos de *Musa* spp., procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) y de la colección del germoplasma del CIBE existen genes candidatos de resistencia a Sigatoka negra”.

### **3.1. Material Vegetal.**

Para este estudio se utilizaron 21 plántulas de banano, correspondientes a cinco accesiones susceptibles, 12 accesiones tolerantes y cuatro accesiones resistentes, procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) además de cinco plántulas de banano correspondiente a cinco accesiones susceptibles y dos plántulas de plátano correspondientes a dos accesiones susceptibles procedentes de la colección de germoplasma del CIBE. Las accesiones y cultivares de banano y plátano con sus niveles de resistencia y ploidía se muestran en la Tabla 3.1.

**TABLA 3.1.**  
**Accesiones y cultivares de banano y plátano analizados en el presente estudio. Se indica el nivel de resistencia a la Sigatoka negra y el nivel de ploidía de acuerdo a la información facilitada por el INIBAP.**

<b>Nombre de Accesión/cultivar</b>	<b>Nivel de resistencia a Sigatoka negra</b>	<b>Nivel de Ploidía</b>
CALCUTTA 4	Resistente*	AA
TUU GIA	Resistente*	AA
YANGAMBI KM5	Resistente*	AAA
T6	Resistente*	AAAA
FHIA-1	Tolerante*	AAAB
FHIA-2	Tolerante*	AAAB
FHIA-3	Tolerante*	AAAB
FHIA-17	Tolerante*	AAAA
FHIA-23	Tolerante*	AAAA
IRFA-905	Tolerante*	AA
IRFA-908	Tolerante*	AAAB
TMBX 5295-1	Tolerante*	AABB?
SH-3640	Tolerante*	4n
B-7925	Tolerante*	3n
CRBP-39	Tolerante*	AAAB
FHIA-18	Tolerante*	AAAB
NIYARMA YIK	Susceptible*	AA
PISANG BERLIN	Susceptible*	AA
GRAN ENANO	Susceptible*	AAA
GCTCV-215	Susceptible*	AAA
GCTCV-219	Susceptible*	AAA
VERDE PATUCHO	Susceptible	
MORADO	Susceptible	AAA
GROSS MICHEL	Susceptible	AAA
ORITO	Susceptible	AA
WILLIAMS	Susceptible	AAA
DOMINICO	Susceptible	AAB
BARRAGANETE	Susceptible	AAB

\* De acuerdo a la clasificación realizada por INIBAP.

## **3.2. Caracterización Molecular.**

### **3.2.1. Extracción de ADN.**

El total de ADN se aisló de un gramo de tejido de hoja de plántula de banano o plátano de invernadero o in vitro, siguiendo los protocolos de extracción de ADN descritos por DellaPorta y Aljanabi (73, 74) y modificado por Santos (16). El material de la hoja se colocó en un mortero y fue triturado con ayuda de nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo muy fino, transfiriendo el polvo a un tubo de 50 ml. Se añadió cuatro mililitros de Tampón de extracción de ADN que contiene 100 mM TRIS-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM B-mercaptoetanol y 2 % PVP (Polyvinyl pyrrolidone, MW 10.000) en el tubo. El SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) se añadió a una concentración final de 2 % mezclando el contenido del tubo y se incubó por 10 min a 55 °C.

Se añadió 1.300  $\mu$ l 5 M Acetato de Potasio, mezclando el contenido del tubo en un vortex por unos segundos y centrifugando durante 10 min a 12.000 RPM y 4°C.

Se recolectó la mayor cantidad posible de sobrenadante en un tubo de 50 ml, evitando recolectar el pellet. Se añadió tres mililitros 6 M Cloruro de Sodio mezclando el contenido del tubo en un vortex por 30 s a la mayor velocidad. Se centrifugó por 10 min a 12.000 RPM y 4 °C recolectando el sobrenadante en un tubo de 1,5 ml. Se añadió RNAasa a una concentración final de 200  $\mu$ g/ml mezclando el contenido del tubo y se incubó a 37 °C por 15 min. Se centrifugó a 12.000 RPM y 4 °C por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo resistente a cloroformo. Se añadió igual volumen de Cloroformo: Isoamilalcohol (24:1), mezclando el contenido del tubo, centrifugando a 12.000 RPM y 4 °C por cinco minutos y transfiriendo la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Finalmente se añadió igual volumen de Isopropanol al sobrenadante, mezclando bien e incubando la muestra a -20 °C por lo menos 30 min.

Luego se centrifugó a 12.000 RPM y 4 °C por 20 min. Se lavó el ADN con etanol al 70 % y se dejó secar brevemente disolviéndolo en un mililitro de agua estéril.

### 3.2.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Todas las reacciones de PCR con iniciadores de actina fueron realizadas en tubos de Eppendorf de 0.2 mL con la máquina de PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). Las mezclas de PCR contenían 1X Tampón *Taq*, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μM Iniciador inicial y final, 0.05 U μL<sup>-1</sup> *Taq* Pol, 20 – 100 ng ADN en un volumen total de 20 μL.

El programa de la PCR consistió de una desnaturalización inicial a 95.0 °C por dos minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 95.0 °C por 30 s, anillamiento de iniciadores a 60.0 °C por 30 s y elongación a 68.0 °C por 30 s, culminado con una elongación final de 68.0 °C por dos minutos.

Los iniciadores usados y sus características se muestran en la Tabla 3.2.

**TABLA 3.2.**  
**Iniciadores de Actina en PCR. Características y longitud esperada del amplicón.**

Iniciador	Gen	Secuencia del Iniciador (5'-3')	Tm (°C)	GC (%)	Longitud del amplicón (pb)
1F3	actina	CCCAAGGCAAACCGAGAGAAG	65°C	57	225 <sup>a</sup>
R2	actina	GTGGCTCACACCATCACCAG	63°C	60	150 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Tamaño en pares de bases esperado cuando se utiliza ADN genómico como molde.

<sup>b</sup> Tamaño en pares de bases esperado cuando se utiliza ADNc como molde.

Una vez culminado el programa se colocó el producto de la PCR en geles de agarosa al uno por ciento que fueron preparados con 100 ml de tampón SBE 1X (NaOH 0.4g/L, ácido bórico 2.5 g/L), un gramo de agarosa y 10 µl Syber Safe, cada gel tenía 20 pocillos, se colocaron 18 µl de cada mezcla de PCR más 2 µL de loading buffer, y cuatro microlitros de marcador de 100 pb (marca invitrogen) en cada pocillo, las muestras fueron corridas a 120 V por 20 min en un cámara de electroforesis que contenía tampón SBE 1X (NaOH 0.4g/L, ácido bórico 2.5 g/L) y luego se analizó la presencia de bandas usando luz UV en el equipo GEL-DOC-XR de Bio-Rad.

### **3.2.3. Determinación de presencia de genes candidatos de resistencia.**

Todas las reacciones de PCR con iniciadores de genes de quitinasa fueron realizadas en tubos de Eppendorf de 0.2 mL con la máquina de PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Las mezclas de PCR contenían GoTaq 1X (Promega), 0.5  $\mu\text{M}$  Iniciador inicial y final, 2.5 – 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  ADN en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$ .

El programa de la PCR consistió de una desnaturalización inicial a 94.0 °C por dos minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94.0 °C por 30 s, anillamiento de iniciadores a 60.0 °C por 30 s y elongación a 72.0 °C por dos minutos, culminado con una elongación final de 72.0 °C por cinco minutos. Los iniciadores usados y sus características se muestran en la Tabla 3.3.

**TABLA 3.3.**  
**Iniciadores de genes de quitinasa en PCR.**  
**Características y longitud esperada del amplicón.**

Iniciador	Par del Iniciador	Secuencia del Iniciador (5'-3')	T <sub>m</sub> <sup>a</sup> (°C)	Longitud del amplicón (pb) <sup>b</sup>
CIBE 1	CIBE 2	ATCAATCCCACGTGCAGTCT	60.54	1.341
CIBE 2	CIBE 1	ATTCCTTCCAGGAGCACAA	59.67	1.341
CIBE 3	CIBE 4	ACGTACAACGCCTTCATCG	59.73	757
CIBE 4	CIBE 3	GCGTTATTACATGGATTCGTCA	59.86	757

<sup>a</sup> T<sub>m</sub>: Temperatura de fusión; <sup>b</sup> pb: Pares de bases. Los iniciadores CIBE 1 y CIBE 2 se diseñaron a partir de la accesión de *Musa* AY507150.1 mientras que los iniciadores CIBE3 y CIBE4 fueron a partir de la accesión de *Musa* AJ277278.1 del Gen Bank.

Todas las reacciones de PCR con iniciadores de genes análogos fueron realizadas en tubos de Eppendorf de 0.2 mL con el equipo de PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Las mezclas de PCR contenían en concentración final GoTaq 1X (Promega), 0.5  $\mu\text{M}$  de cada iniciador y, 2.5 – 10  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  ADN en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ .

El programa de la PCR consistió de una desnaturalización inicial a 96.0 °C por cinco minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 96.0 °C por un minuto, anillamiento de iniciadores a 45.0 °C por un minuto y elongación a 72.0 °C por un minuto, culminado con una elongación final de 72.0 °C por 10 min. Los iniciadores usados y sus características se muestran en la Tabla 3.4.

**TABLA 3.4.**  
**Iniciadores de genes análogos en PCR.**  
**Características y longitud esperada del amplicón**  
 (54).

Iniciador	Par del Iniciador	Secuencia del Iniciador (5'-3') <sup>a</sup>	Longitud del amplicón (pb)
CIBE 5	CIBE 6	GAGGTACTTCCTGGTGCTGGAYGAYRTBTGG	650
CIBE 6	CIBE 5	CGGCCAAGTCGTGCAYVAKRTCRTGCA	650
CIBE 7	CIBE 8	GGIATGGGIGGIIIGGIAARACIAC	650
CIBE 8	CIBE 7	AIITYIRIIRYYAAIGGIAGICC	650

<sup>a</sup> Degenerate code: I = inosinina; R = A/G; Y = C/T; M = A/C; K = G/T; W = A/T; S = C/G; B = C/G/T; D = A/G/T; H = A/C/T; V = A/C/G; N = A/C

Una vez culminado los programas con iniciadores de quitinasa y de genes análogos se colocó el producto de la PCR en geles de agarosa al uno por ciento que fueron preparados con 100 ml de tampón SBE 1X (NaOH 0.4g/L, ácido bórico 2.5 g/L), un gramo de agarosa y 10 µl Syber Safe (Invitrogen), cada gel de 20 porcillos, se colocaron 20 µl de cada mezcla de PCR, y cuatro microlitros de marcador de 100 pb (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Las muestras fueron corridas a 120 V por 20 min en una cámara de electroforesis que contenía tampón SBE 1X (NaOH 0.4g/L, ácido bórico 2.5 g/L).

Se analizó la presencia de bandas usando luz UV en el equipo GEL-DOC-XR (Bio-Rad).

Asimismo, se realizó un análisis del patrón de los amplicones después de ser digeridos con enzimas de restricción.

Todos los cortes de enzimas de restricción de la mezcla de PCR con genes de quitinasa fueron realizadas en tubos de Eppendorf de 0.2 mL con el equipo de PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). Las mezclas contenían 10  $\mu$ L del producto de PCR, 0.1  $\mu$ L de enzima (1 U) y 1,5  $\mu$ l de Buffer en un volumen total de 15  $\mu$ L.

Se incubó a 37.0 °C por dos horas para digestión de la enzima *Mbol* y por cuatro horas para digestión de la enzima *HhaI*, culminado con la desactivación del corte de las enzimas de restricción a 65.0 °C por 15 min.

Una vez culminado la digestión con las enzimas, se colocó el producto cortado en geles de agarosa al uno por ciento. La preparación del gel, la electroforesis y el revelado está descrita arriba.

#### **3.2.4. Clonación de genes.**

Para la clonación de los amplicones, se realizó la PCR con una extensión final de 72°C por 10 minutos. El producto de PCR crudo fue utilizado para la clonación en el vector pCR4-TOPO del kit TOPO TA cloning (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del manual. La confirmación de la clonación se efectuó mediante PCR utilizando los iniciadores M13F (GTAAAACGACGGCCAG) y M13R (CAGGAAACAGCTATGAC) en colonias de *E. coli* resistentes a kanamicina. A las colonias que presentaban el amplicón de acuerdo al tamaño esperado, se realizó un cultivo líquido para extracción del plásmido. Los plásmidos se enviaron a secuenciación comercialmente en Macrogen (Maryland, Estados Unidos).

### 3.2.5. Análisis bioinformático de amplicones.

Las secuencias de quitinasa y de genes análogos de resistencia fueron obtenidos de dos plántulas de banano, correspondientes a dos accesiones resistentes a la Sigatoka negra, procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Leuven, Bélgica) además de dos cultivares de banano y dos de plátanos susceptibles a la Sigatoka negra procedentes de la colección de germoplasma del CIBE. Las accesiones de banano resistentes fueron 'Calcutta 4' y 'Tuu Gia', las susceptibles 'Williams', 'Orito', 'Barraganete' y 'Dominico'. Una vez obtenidas las secuencias de las cuatro variedades de banano y las dos de plátano, se utilizaron los programas blastn y pDRAW32 para la alineación individual de cada una de las secuencias, ClustalW para la alineación múltiple de las secuencias y Clustal Phylogenetic para obtener el dendograma y la relación que hay entre las variedades resistentes y susceptibles a la Sigatoka negra con la presencia de genes de quitinasa y genes análogos de resistencia.

### **3.2.6. Determinación de expresión génica de genes candidatos.**

Se realizó una inoculación de *M. fijiensis* en la variedad de banano 'Calcutta-4' en condiciones controladas (75). Para la determinación de expresión génica se utilizó la técnica de RT-PCR.

#### **Extracción de ARN.**

Se utilizó aproximadamente 50 mg de muestras de la hoja número 3 después de seis días de haber sido inoculada con *M. fijiensis* y del control también (aplicación de la solución conidial pero sin conidias de *M. fijiensis*). La extracción se llevó a cabo utilizando el kit Spectrum™ Plant Total RNA (SIGMA). EL ARN total fue tratado con DNAsa (RQ1 RNase- Free, Promega) de acuerdo a lo recomendado por la empresa.

### Síntesis de cDNA.

Se utilizó 1 µg de ARN para la síntesis de cDNA utilizando el kit GoTaq® 2-Step RT- PCR System (Promega) de acuerdo lo recomendado por la empresa.

### RT-PCR.

Se realizó la RT-PCR utilizando el siguiente protocolo (Tabla 3.5).

**TABLA 3.5.**  
**Protocolo de PCR para determinación de expresión génica.**

Componente	Volumen (1rxn)	Concentración final
Green GoTaq (Promega)	5 µl	1X
Primer Forward	0,25	250nM
Primer Reverse	0,25	250nM
CDNA	1	-
H <sub>2</sub> O	3,5	-
Volumen final	10 µl	-

Los iniciadores utilizados fueron qrtpcr-chitinase-F1 (GACGACGCCAAGAAGAAGAG) y qrtpcr-chitinase-R1 (TAGTCCGATGAGGGGTTCTG) para el gen de quitinasa. Las condiciones de PCR en el termociclador fueron: desnaturalización inicial 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s., 60°C por 30 s., y 72°C por 45 s.; con una extensión final de 72°C por 2 min. La electroforesis y revelado del gel se realizó de acuerdo a lo descrito arriba.

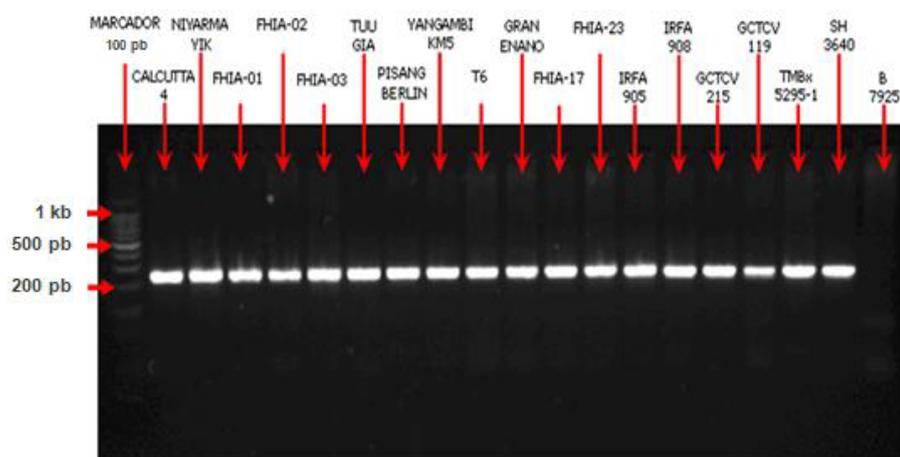
## **CAPÍTULO 4**

### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

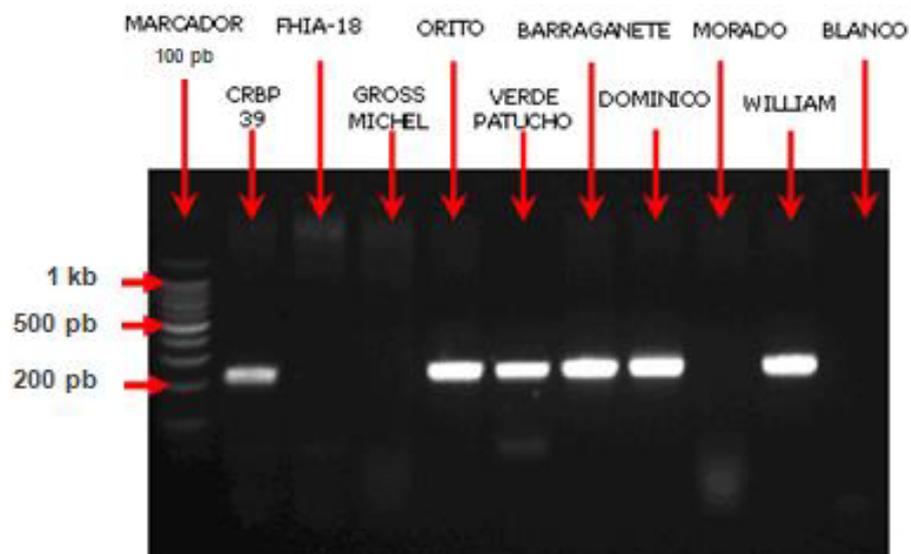
Un total de dos pares de iniciadores fueron utilizados para identificar genes candidatos de resistencia a Sigatoka negra de 21 genotipos de banano, procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica), además de cinco genotipos de banano y dos genotipos de plátano procedentes del departamento de cultivos protegidos del CIBE.

#### 4.1. Extracción de ADN en variedades de banano y plátano.

Con el ADN extraído de todas las variedades de banano y plátano se preparó una mezcla de PCR con iniciadores de Actina 1F3 y R2 (FIGURAS 4.1-4.2).

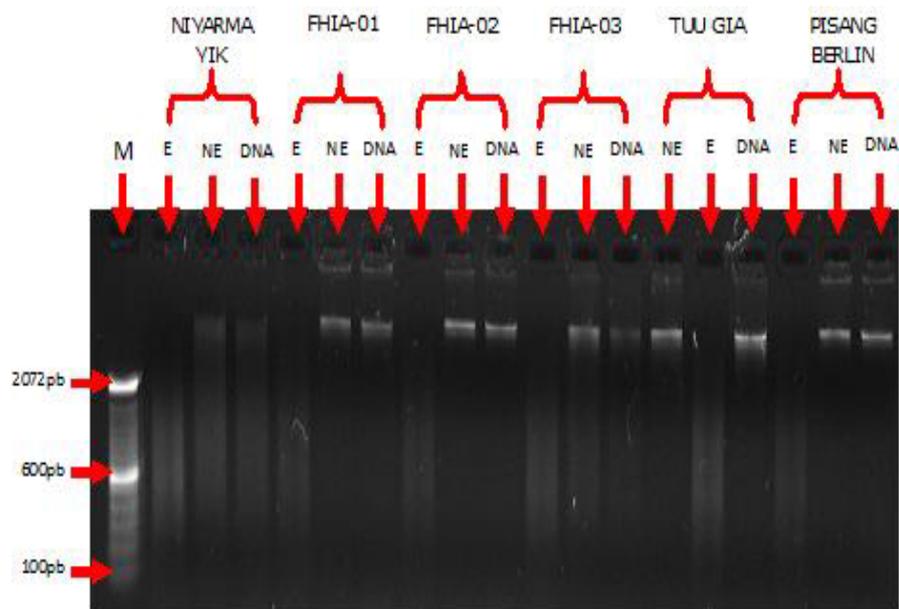


**FIGURA 4.1. Presencia de amplicones con iniciadores de actina 1F3 y R2.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Iniciadores de Actina 1F3 y R2. Marcador 100pb DNA ladder (PROMEGA). Voltaje 120 Amperios. Tiempo 20 min.

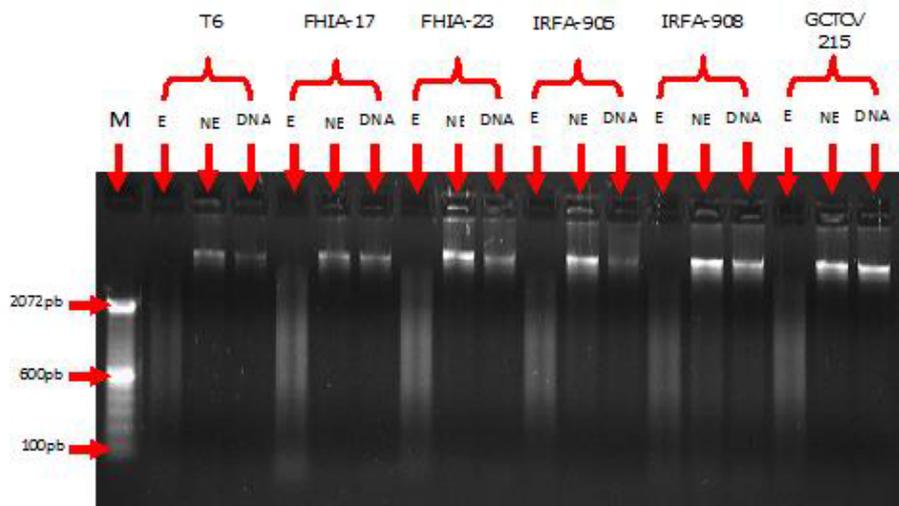


**FIGURA 4.2. Presencia de amplicones con iniciadores de actina 1F3 y R2.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Iniciadores de Actina 1F3 y R2. Marcador 100pb DNA ladder (PROMEGA). Voltaje 120 Amperios. Tiempo 20 min.

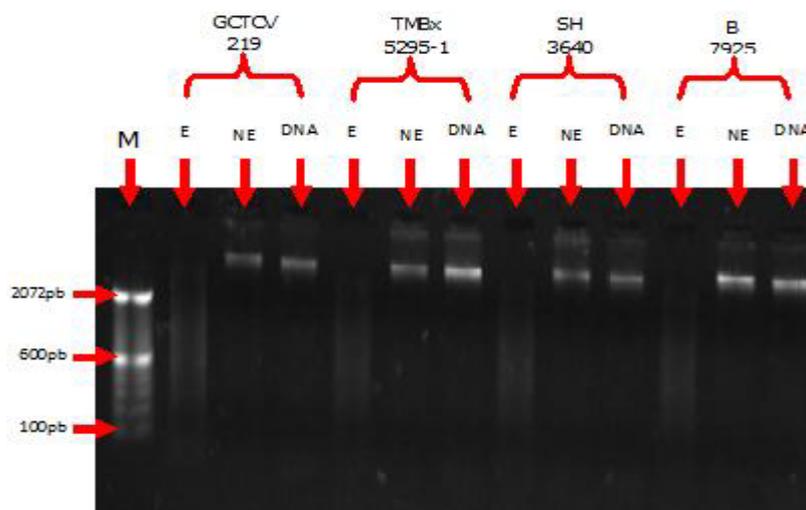
Se determinó la calidad del ADN extraído mediante digestión con la enzima *Hae* III (FIGURAS 4.3-4.9).



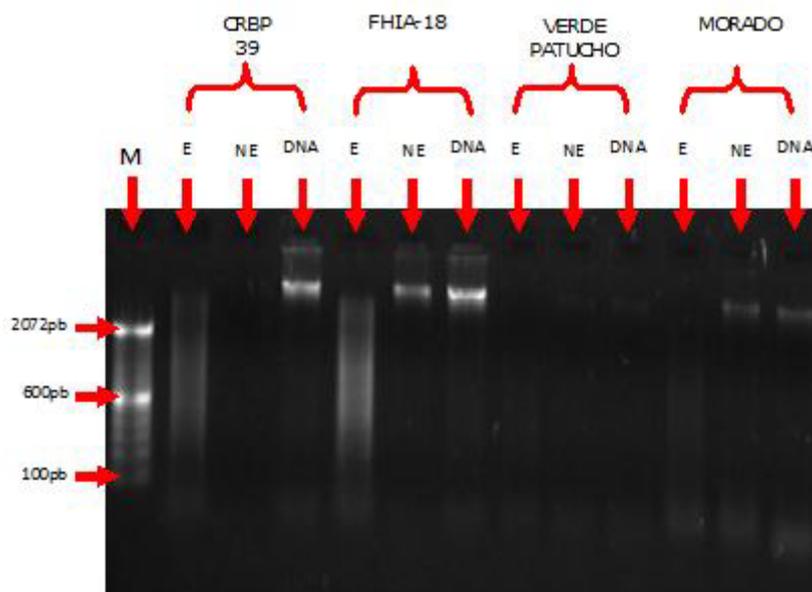
**FIGURA 4.3. Control de calidad de ADN.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% a 120 Voltios, por 20 minutos, el ADN fue digerido con la enzima de restricción de endonucleasa *Hae* III. El gel fue teñido con 0.01 mg/ml de Syber Safe. **M** marcador de 100pb marca Invitrogen; **E** 500 ng de ADN digerido; **NE** 500 ng de ADN no digerido; **DNA** 500 ng de ADN.



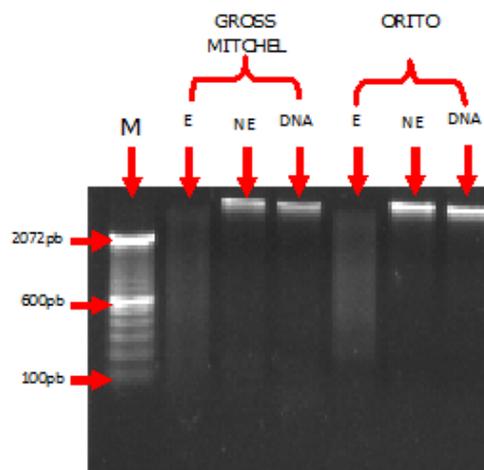
**FIGURA 4.4. Control de calidad de ADN.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% a 120 Voltios, por 20 minutos, el ADN fue digerido con la enzima de restricción de endonucleasa *Hae* III. El gel fue teñido con 0.01 mg/ml de Syber Safe. **M** marcador de 100pb marca Invitrogen; **E** 500 ng de ADN digerido; **NE** 500 ng de ADN no digerido; **DNA** 500 ng de ADN.



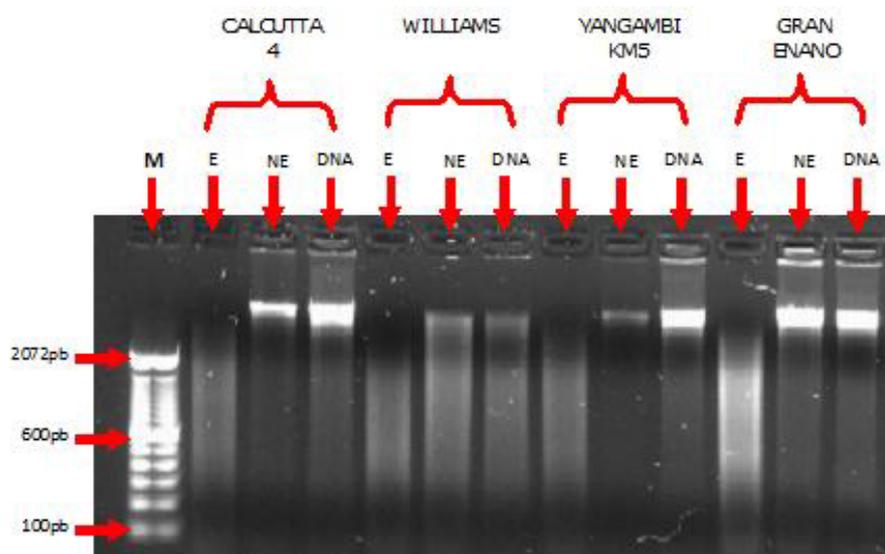
**FIGURA 4.5. Control de calidad de ADN.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% a 120 Voltios, por 20 minutos, el ADN fue digerido con la enzima de restricción de endonucleasa *Hae* III. El gel fue teñido con 0.01 mg/ml de Syber Safe. **M** marcador de 100pb marca Invitrogen; **E** 500 ng de ADN digerido; **NE** 500 ng de ADN no digerido; **DNA** 500 ng de ADN.



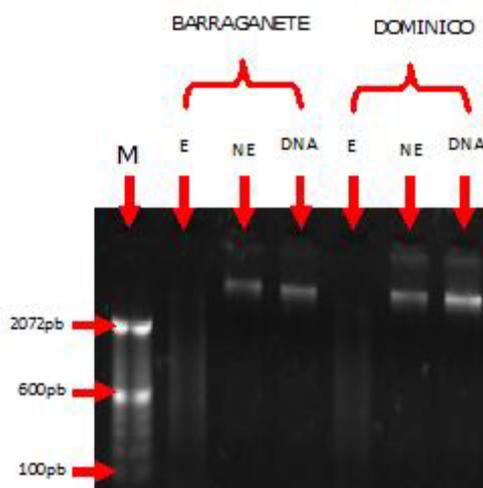
**FIGURA 4.6. Control de calidad de ADN.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% a 120 Voltios, por 20 minutos, el ADN fue digerido con la enzima de restricción de endonucleasa *Hae* III. El gel fue teñido con 0.01 mg/ml de Syber Safe. **M** marcador de 100pb marca Invitrogen; **E** 500 ng de ADN digerido; **NE** 500 ng de ADN no digerido; **DNA** 500 ng de ADN.



**FIGURA 4.7. Control de calidad de ADN.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% a 120 Voltios, por 20 minutos, el ADN fue digerido con la enzima de restricción de endonucleasa *Hae* III. El gel fue teñido con 0.01 mg/ml de Syber Safe. **M** marcador de 100pb marca Invitrogen; **E** 500 ng de ADN digerido; **NE** 500 ng de ADN no digerido; **DNA** 500 ng de ADN.



**FIGURA 4.8. Control de calidad de ADN.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% a 120 Voltios, por 20 minutos, el ADN fue digerido con la enzima de restricción de endonucleasa *Hae* III. El gel fue teñido con 0.01 mg/ml de Syber Safe. **M** marcador de 100pb marca Invitrogen; **E** 500 ng de ADN digerido; **NE** 500 ng de ADN no digerido; **DNA** 500 ng de ADN.

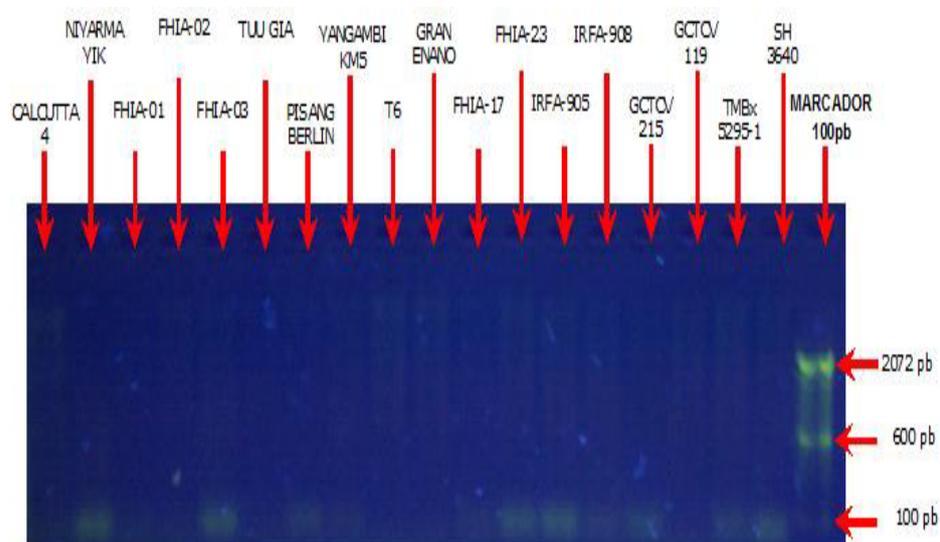


**FIGURA 4.9. Control de calidad de ADN.** Electroforesis en gel de Agarosa al 1% a 120 Voltios, por 20 minutos, el ADN fue digerido con la enzima de restricción de endonucleasa *Hae* III. El gel fue teñido con 0.01 mg/ml de Syber Safe. **M** marcador de 100pb marca Invitrogen; **E** 500 ng de ADN digerido; **NE** 500 ng de ADN no digerido; **DNA** 500 ng de ADN.

## 4.2. Presencia de genes de quitinasa y análogos de resistencia en variedades de banano y plátano.

No hubo presencia de amplicones cuando se utilizaron los iniciadores CIBE 1 y CIBE 2 en el ADN de todas las variedades de banano y plátano (FIGURAS 4.10-4.12) pero si hubo presencia de amplicones de quitinasa amplificado con los iniciadores CIBE 3 y CIBE 4 en el ADN de algunas variedades de banano y plátano (FIGURAS 4.13-4.15).

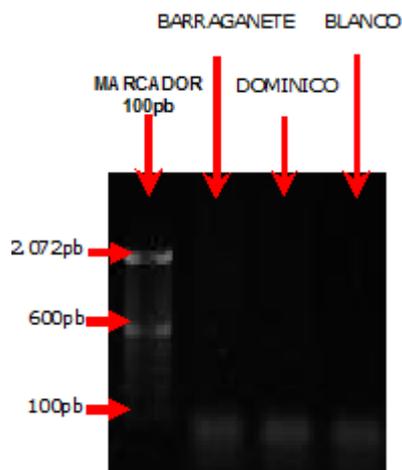
Si hubo presencia de genes análogos de resistencia con los iniciadores CIBE 5 y CIBE 6 en el ADN de algunas variedades de banano y plátano (FIGURAS 4.16-4.18) mientras que no hubo presencia de amplicones con los iniciadores CIBE 7 y CIBE 8 en el ADN de todas las variedades de banano y plátano (FIGURAS 4.19-4.21).



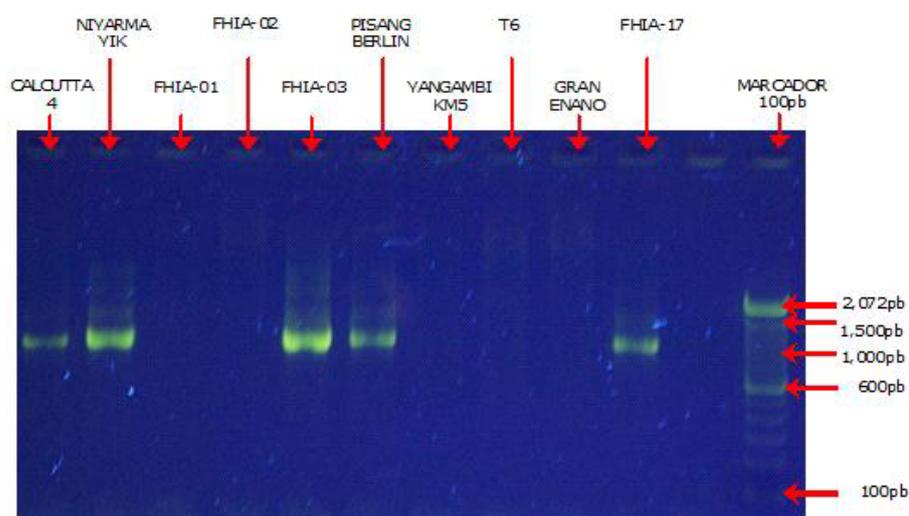
**FIGURA 4.10. Presencia de amplicones de quitinasa con los iniciadores CIBE 1 y CIBE 2 en ADN de banano y plátano.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



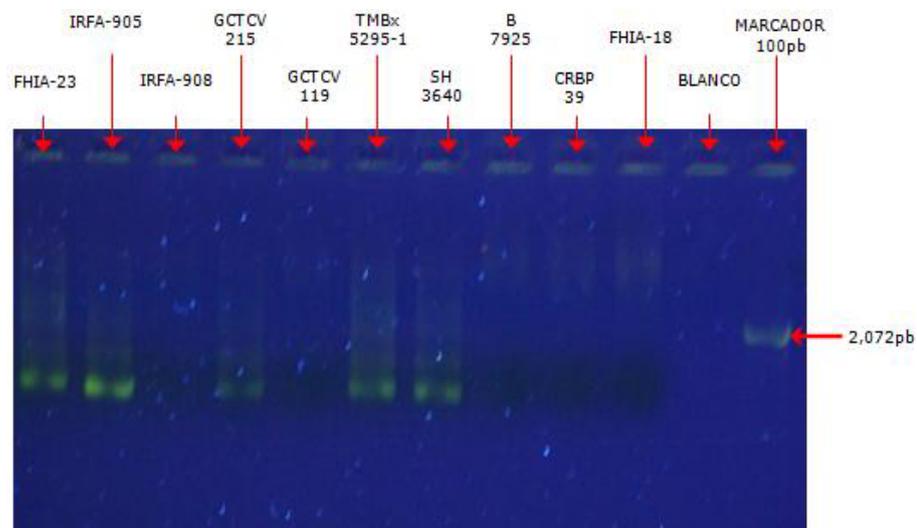
**FIGURA 4.11. Presencia de amplicones de quitinasa con los iniciadores CIBE 1 y CIBE 2 en ADN de banano y plátano.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



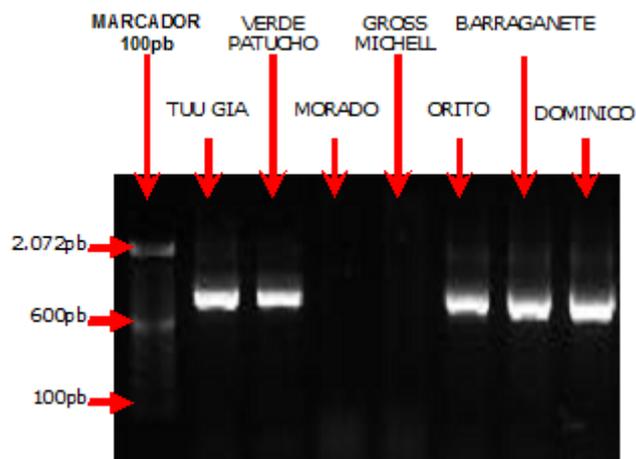
**FIGURA 4.12. Presencia de amplicones de quitinasa con los iniciadores CIBE 1 y CIBE 2 en ADN de banano y plátano.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



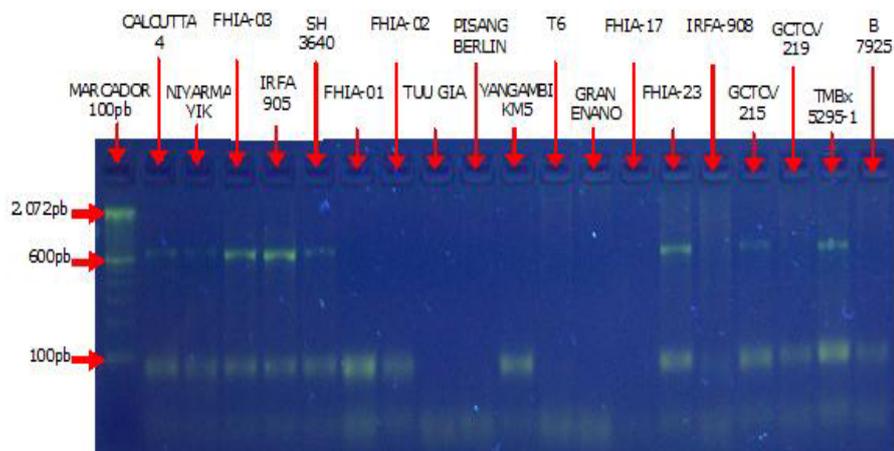
**FIGURA 4.13. Presencia de amplicones de quitinasa con los iniciadores CIBE 3 y CIBE 4 en ADN de banano y plátano.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



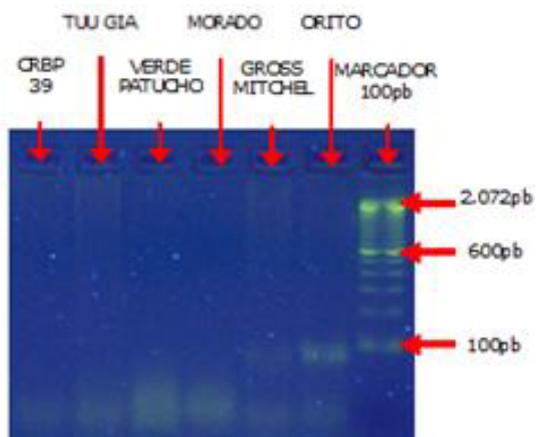
**FIGURA 4.14. Presencia de amplicones de quitinasa con los iniciadores CIBE 3 y CIBE 4 en ADN de banano y plátano.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



**FIGURA 4.15. Presencia de amplicones de quitinasa con los iniciadores CIBE 3 y CIBE 4 en ADN de banano y plátano.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.

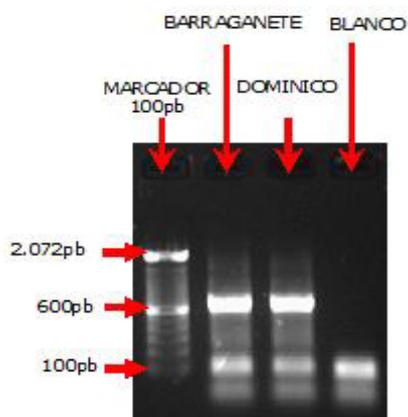


**FIGURA 4.16. Presencia de amplicones de análogos de resistencia CIBE 5 y CIBE 6 en ADN de banano y plátano.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



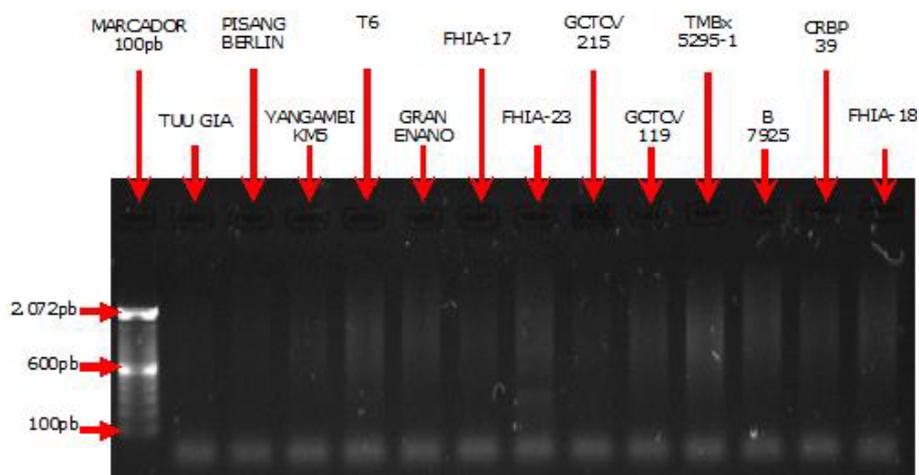
**FIGURA 4.17. Presencia de amplicones de análogos de resistencia CIBE 5 y CIBE 6 en ADN de banano y plátano.**

Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



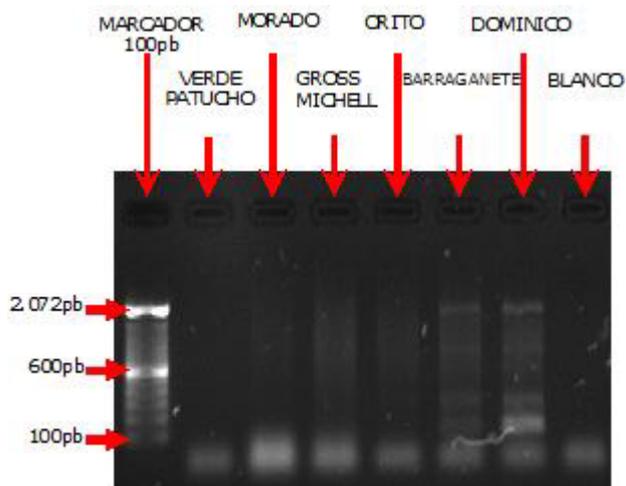
**FIGURA 4.18. Presencia de amplicones de análogos de resistencia CIBE 5 y CIBE 6 en ADN de banano y plátano.**

Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



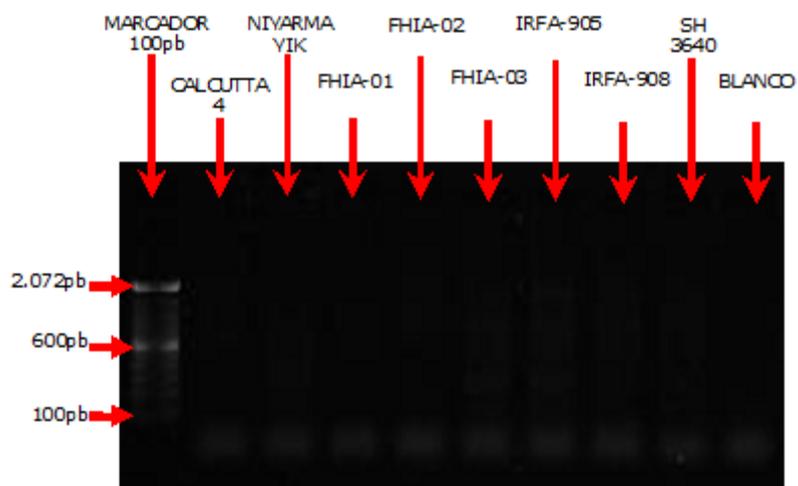
**FIGURA 4.19. Presencia de amplicones de análogos de resistencia CIBE 7 y CIBE 8 en ADN de banano y plátano.**

Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



**FIGURA 4.20. Presencia de amplicones de análogos de resistencia CIBE 7 y CIBE 8 en ADN de banano y plátano.**

Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.



**FIGURA 4.21. Presencia de amplicones de análogos de resistencia CIBE 7 y CIBE 8 en ADN de banano y plátano.**

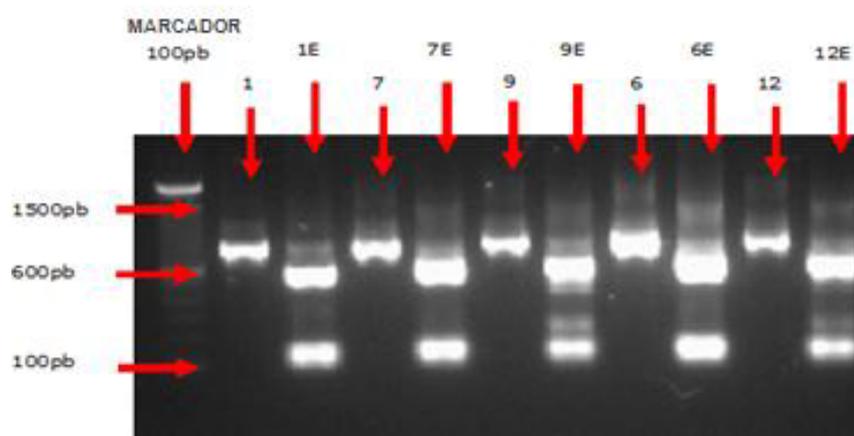
Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios.

La presencia de banda de genes de quitinasa y análogos en el ADN de todas las variedades de banano y plátano se detalla a continuación (Tabla 4.1.).

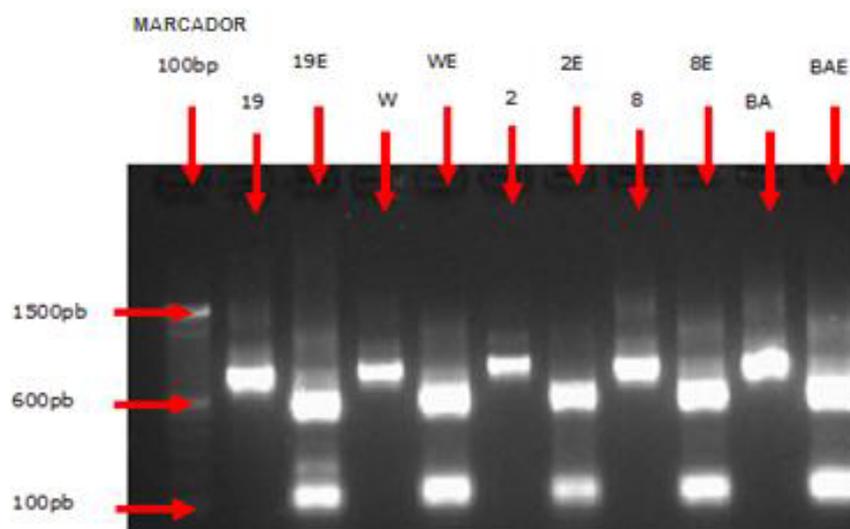
**Tabla 4.1.**  
**Presencia de bandas con genes de quitinas o análogos de resistencia.**

		<b>Presencia de banda</b>			
		<b>GENES DE QUITINASA</b>		<b>GENES ANALOGOS</b>	
<b>Resistencia</b>	<b>Nombre de Accesoión</b>	<b>Cibe 1-2</b>	<b>Cibe 3-4</b>	<b>Cibe 5-6</b>	<b>Cibe 7-8</b>
<b>Resistente</b>	Calcutta 4	No	Si	Si	No
	Tuu Gia	No	Si	No	No
	Yangambi Km5	No	Si	No	No
	T6	No	Si	No	No
<b>Tolerante</b>	Fhia-1	No	Si	No	No
	Fhia-2	No	No	No	No
	Fhia-3	No	Si	Si	No
	Fhia-17	No	Si	No	No
	Fhia-23	No	Si	Si	No
	Irfa-905	No	Si	Si	No
	Irfa-908	No	Si	No	No
	TMBx 5295-1	No	Si	Si	No
	SH-3640	No	Si	Si	No
	B-7925	No	No	No	No
	CRBP-39	No	No	No	No
Fhia-18	No	No	No	No	
<b>Susceptible</b>	Niyarma Yik	No	Si	Si	No
	Pisang Berlin	No	Si	No	No
	Gran Enano	No	No	No	No
	Gctcv-215	No	Si	Si	No
	Gctcv-219	No	No	No	No
	Verde Patucho	No	Si	No	No
	Morado	No	No	No	No
	Gross Michell	No	No	No	No
	Orito	No	Si	No	No
	Barraganete	No	Si	Si	No
	Dominico	No	Si	Si	No
William	No	Si	Si	No	

No hubo diferencia en el tamaño de las bandas cortadas por las enzimas de restricción (*Hha* I y *Mbo* I) de los genes candidatos de resistencia en variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad (FIGURAS 4.22-4.25).

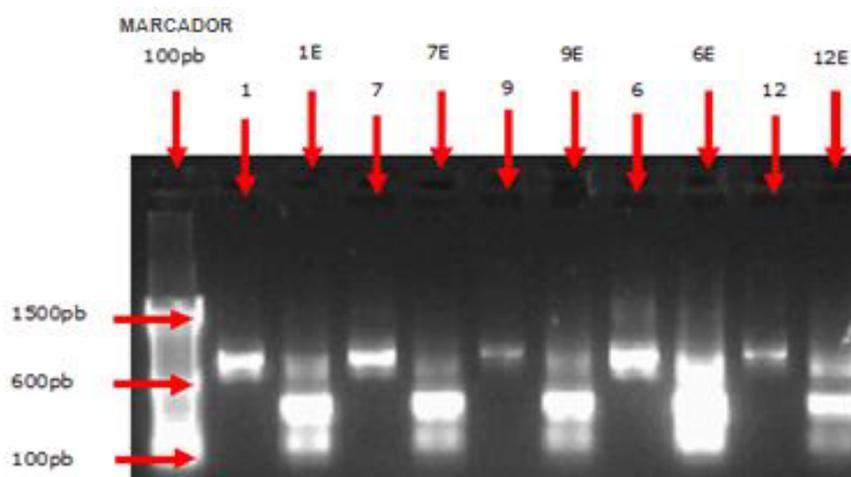


**FIGURA 4.22. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes, tolerables y susceptibles a la enfermedad.** Gel de Agarosa al 1 %. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Iniciadores de genes de quitinasa Cibe 3 y Cibe 4. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios. 1 ADN Calcutta4, 7 ADN Tuu Gia, 9 ADN Yangambi Km5, 6 ADN Fhia 3, 12 ADN Fhia 17. Los números enteros indican ADN total.; si son seguido de la letra E indican que se realizó digestión con la enzima *Hha* I.



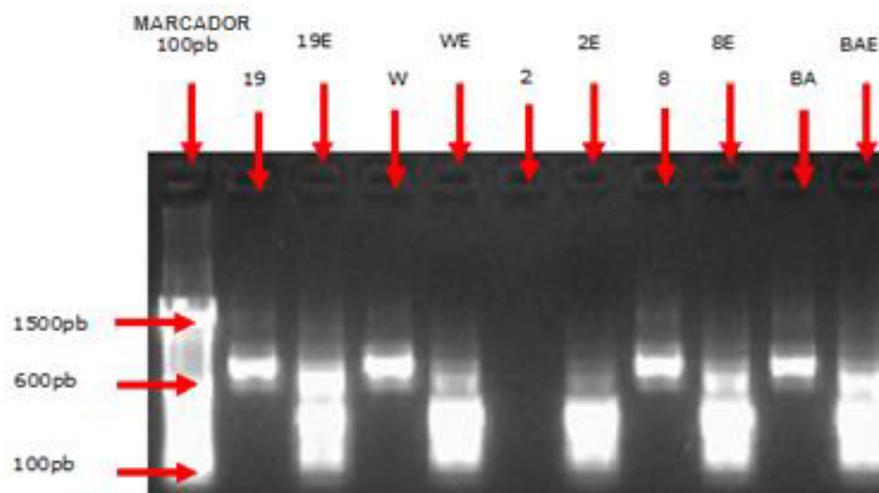
**FIGURA 4.23. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes, tolerables y susceptibles a la enfermedad. Gel de Agarosa al 1%.**

El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Iniciadores de genes de quitinasa Cibe 3 y Cibe 4. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios. 19 ADN SH-3640, W ADN Williams, 2 ADN Niyarma Yik, 8 ADN Pisang Berlin, BA ADN Barraganete. Los números enteros indican ADN total.; si son seguido de la letra E indican que se realizó digestión con la enzima *Hha* I.



**FIGURA 4.24. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad. Gel de Agarosa al 1 %.**

El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Iniciadores de genes de quitinasa Cibe 3 y Cibe 4. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios. 1 ADN Calcutta4, 7 ADN Tuu Gia, 9 ADN Yangambi Km5, 6 ADN Fhia 3, 12 ADN Fhia 17. Los números enteros indican ADN total.; si son seguido de la letra E indican que se realizó digestión con la enzima *Mbo* I.



**FIGURA 4.25. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad.** Gel de Agarosa al 1%. El gel fue hecho con 0.01 mg/ml Syber Safe. Iniciadores de genes de quitinasa Cibe 3 y Cibe 4. Marcador 100pb DNA ladder INVITROGEN. Tiempo de corrido de gel 20 minutos. Voltaje de corrido 120 Amperios. 19 ADN SH-3640, W ADN Williams, 2 ADN Niyarma Yik, 8 ADN Pisang Berlin, BA ADN Barraganete. Los números enteros indican ADN total.; si son seguido de la letra E indican que se realizó digestión con la enzima *Mbo* I.

Hubo diferencia en las secuencias de ADN de 'Calcutta-4', 'Tuu Gia', 'Williams', 'Orito', 'Barraganete' y 'Dominico' con genes de quitinasa (FIGURA 4.26.).

A continuación se detallada la secuencia de cada una de las variedades.

**'CALCUTTA-4'**

1 ACGTACAACG CCTTCATCGC CGCCACCAAC TCCTTCAGTG GGTCGGGAC  
51 GACCGGCGAC GACGCCACGA AGAAGAGGGA GATCGCGGCT TTCTTGCGC  
101 AGACGTCTCA CGAGACGACA GGTAATTCGT ACATCTCCCG AGGCTCGTAA  
151 ACTGTTTATG GATAGAGAGC TGAATGTATG GGGTTTGGCA GGTGGGTGGT  
201 CGACGGCGCC CGATGGTCCG TACGCGTGGG GTTACTGCTT CGTCCAGGAA  
251 CAGAACCCTT CATCAGACTA CTGCGTCGCC AGCTCGCAGT GGCCGTGCGC  
301 TGCAGGCAAG AAGTACTACG GCCGAGGCC CATCCAAATC TCATTGTAAG  
351 CCATACTCTT ACAGTTCATC GCCGCGATCG AATTCACAAC GATGGCCTTT  
401 CTAACGCAAC AATCCGATGT GTTCTGCGTG CAGCAACTAC AACTACGGGC  
451 CGGCCGGGAG AGCCATCGGC TCCGACCTGC TCAACAACCC AGACCTGGTG  
501 GCCACCGACG CGACCATCTC GTTCAAGACG GCTCTGTGGT TCTGGATGAC  
551 TGCTCAGTCG CCCAAGCCGT CGTGCCACGA CGTGATAACC GGGAGGTGGA  
601 CGCCACCCAA CGCCGACCGG GCGGCCGGAA GGCTTCCGGG CTACGGNGTC  
651 ACCACCNACA TCATCAATGG AGGGTTTGTA GTGCGCGAAA GGTCCCGAT  
701 GCCNGGGTGG CGGATAGGAT CGGCTTCTAC ANNAGGTACN GNGACTTGCT  
751 G

**'TUU-GIA'**

1 CGTACAACGC CTTTCATCGCC GCCGCCAACT CCTTCAGCGG GTTCGGGACG  
 51 ACGGGCGACG ACGCCACGAA GAAGAGGGAG ATCGCGGCTT TCTTGCGCA  
 101 GACGTCTCAC GAGACGACAG GTAATTCTTA CATCTCCCGA GGCTCGTCAA  
 151 CAGTTTATGG ATAGAGAGCT GAATGCATTG GGTTTGGCAG GTGGGTGGTC  
 201 GACGGCGCCC GATGGCCCGT ACGCGTGGGG TTACTIONTTC GTCCAGGAAC  
 251 AGAACCCCTC ATCGGACTAC TCGTTCGCCA GCTCGCAGTG GCCGTGCGCT  
 301 GCAGGCAAGA AGTACTACGG CCGAGGCCCC ATCCAAATCT CATTGTAAGC  
 351 CATACTCTTA CAGTTCATCG CCGCGATCGA GTTCACAACG ATGGCCTTTC  
 401 TAACGCAACA ATCCGATGTG TTCTGCGTGC AGCAACTACA ACTACGGGCC  
 451 GGCCGGGAGA GCCATCGGCT CCGACCTGCT CAACAACCCA GACCTGGTGG  
 501 CCACCGACCC GACCATCTCC TTCAAGACGG CTCTGTGGTT CTGGATGACT  
 551 CCTCAGTCGC CCAAGCCGTC GTGCCACGAC GTGATAACCG GGAGCTGGAC  
 601 GCCATCCAAC GCCGACCGGG CGGCCGGAAG GCTTCCGGGC TACGGTGTCA  
 651 CCACCAACAT CATCAATGGA GGGTTGGAGT GCGGAAAGG GTCCGATGCC  
 701 AGGGTGGCGG ATAGGATCGG CTTCTACAAG AGGTACTGCG ACTTGCTGGG  
 751 GGTGAGCTAC GGAGACAACT TGGACTGCTA CAACCAGAGT CCCTTACTT  
 801 AGTCCGATAC TACTGTGACG AATCCATGTA ATAACGC

**'BARRAGANETE'**

1 CGTACAACGC CTTTCATCGCC GCCGCCAACT CCTTCAGCGG GTTCGGGACT  
 51 ACGGGCGACG ACGCCACGAA GAAGAGGGAG ATCGCGGCTT TCTTGCGCA  
 101 GACGTCTCAC GAGACGACAG GTAATTCGTA CATCTCCCGA GGCTCGTCAA  
 151 CAGTTTATGG ATAGAGAGCT GAATGCATTG GGTTTGGCAG GTGGGTGGTC  
 201 GACGACGCCG GCTGACCCCC CCTTCGGGGG GGACTIONTTC TTCCTCGATG  
 251 AGAAGACCCC CCCNGAGTAC TCGGGCGTCA CCTCCTCTTG GCGGCCGTCT  
 301 GCTGCNTTAA

**'WILLIAMS'**

1 GCGTTATTAC ATGGATTCGT CACAGTAGTC TCGGACTAAG TAAAGGGTTT  
51 CTGGTTGTAG CAGTCCAAGT TGTCTCCGTA GCTCACCCCC AGCATGTCGC  
101 AGTACTTCTT GTAGAAGCCG ATCCTATCCG CCACCCTGGA ATCGGACCCT  
151 TTCCCGCACT CCAACCCTCC ATTGATGATG TTGGTGATGA CACCGTAGCC  
201 CGGAAGCCTT CCGGCCGCCG GGTCCGGCGT GGATGGCGTC CAGCTCCCGG  
251 TTATCACGTC GTGGCACGAC GGCTTGGGCG ACTGAGGAGT CATCCAGAAC  
301 CACAGAGCCG TCTGAAGGA GATGGTCGGG TCGGTGGCCA CCAGGTCTGG  
351 GTTGTGAGC AGGTCGGAGC CGATGGCTCT CCCGGCCGGC CCGTAGTTGT  
401 AGTTGCTGCA CGCAGAACAC ATCGGATTGT TGCATTAGAA AGGCCATCGT  
451 TGTGAACTCG ATCGCGGCGA TGAAGTGTAA GAGTATGGCT TACAATGAGA  
501 TTTGGATGGG GCCTCGGCCG TAGTACTTCT TGCCTGCAGC GCACGGCCAC  
551 TGCAGCTGG CGACGCAGTA GTCCGATGAG GGGTTCTGTT CCTGGACGAA  
601 GCAGTAACCC CACGCGTACG GGCCATCGGG CGCCGTCGAC CACCCACCTG  
651 CCAAACCCAA TGCATTCAGC TCTCTATCCA TAACTGTTG ACGAGCCTCG  
701 GGAGATGTAC GAATTACCTG TCGTCTCGTG AGACGTCTGC GCCAAGAAAG  
751 CCGCGATCTC CCTCTTCTTC GTGGCGTCGT CGCCCGTAGT CCCGAACCCG  
801 CTGAAGGAGT TGGCGGCCGC GATGAAAGGC GTTGTACG

**'ORITO'**

1 CGTACAACGC CTTTCATCGCC GCCACCAACT CCTTCAGTGG GTTCGGGACG  
51 ACCGGCGACG ACGCCACGAA GAAGAGGGAG ATCGCGGCTT TCTTGGCGCA  
101 AACGTCTCAC GAGACGACAG GACTTCGTA CAGCTCCCAA GGCTCGTCAA  
151 CTGTTTATGG ATAGAGAGCT GAATGCATGA GGTTCGGCAG GTGGGTGGCC  
201 GACGGCGCCC GATGGCCCGT ACGCGTGGGG TTAAGTCTTC ATCAGTGAAC  
251 GGAACCCCC AAAGGACTAC TGCCTCGCCA ACTCGCAGTG GCCGTGCGCT  
301 GCAGGCAAGA AATACTACGG CCGGGGCCCC ATCCAAATCT CATAGTAAGC  
351 CATACTTTTA CAGTTCATCG CCGCGATCGA GTTCACAACG ATGGCCTTTC  
401 TAACGCAACA ATCCGATGTG TCCTGCGTGC AGCAACTACA ACTACGGGCG  
451 GGCCGGGAGA GCCATCGGCT CCGACCTGCT CAACAACCCA GACCTGGTGG  
501 CCACCGACGC GACCATCTCG TTCAAGACGG CTCTGTGGTT CTGGATGACT  
551 CCTCAGTCGC CCAAGCCGTC GTGCCACGAC GTGATAACCG GGAGGTGGAC  
601 GCCATCCAAC GCCGACCAGG CGGCCGGAAG GCTTCCGGGC TACGGTGTCA  
651 CCACCAACAT CATCAATGGA GGGTTGGAGT GCGGAAAGG GTACGATGCC  
701 AGGGTGGCGG ATAGGATCGG CTTCTACAGG AGGTACTGCG ACTTGCTGGG  
751 GGTGAGCTAC GGAGACAACT TGGACTGCTA CAACCAGAGA CCCTTTGCTT  
801 CTACAGCAGC TACAGCCACA TTCTAGCGGT GAGCTATGGA GACAACCTGG  
851 NCTGCTACAA CCAGAGACCC TTTACTTCGT CCGATACTAC TGTGACGAAT  
901 CCATGTAATA ACGCAAGGG

## 'DOMINICO'

1 CGTACAACGC CTTTCATCGCC GCCGCCAACT CCTTCAGCGG GTTCGGGACT  
 51 ACGGGCGACG ACGCCACGAA GAAGAGGGAG ATCGCGGCTT TCTTGGCGCA  
 101 GACGTCTCAC GAGACGACAG GTAATTCGTA CAGCTCCCAA GGCTCGTCAA  
 151 CTGTTTATGG ATAGAGAGCT GAATGCATGG GGTGGGAG GTGGGTGGCC  
 201 GACGGCGCCC GATGGCCCGT ACGCGTGGGG TTAAGTCTTC ATCAGTGAAC  
 251 GGAACCCCCC AAAGGACTAC TGCCTCGCCA ACTCGCAGTG GCCGTGCGCT  
 301 GCAGGCAAGA AATACTACGG CCGAGGCCCC ATCCAAATCT CATAGTAAGC  
 351 CATACTCTTA CAGTTCATCG CTGCGATCGA GTTACAACG ATGGCCTTTC  
 401 TAACGCAACA ATCCGATGTG TTCTGCGTGC AGCAACTACA ACTACGGGGC  
 451 GGCCGGGAAA GCCATCGGCT CCGACCTACT CAAGAACCCA GACCTGGTGG  
 501 CCACCGACGC GACCATCTCC TTCAAGACGG CTCTGTGGTT CTGGATGACT  
 551 ACTCAGTCGC CCAAGCCGTC GTGCCACGAC GTGATAACCG GGAGTTGGAA  
 601 GCCAACCAAC GCCGACCGGG CGGCCGGAAG GCTTCCGGGC TACGGTGTCA  
 651 TCACCAACAT CATCAATGGA GGGTTGGAGT GCGGGAAAGG GTCCGATTCC  
 701 AGGGTGGCGG ATAGGATCGG CTTCTACAAG AAGTACTGCG ACTTGCTGGG  
 751 GGTGAGCTAC GGAGACAACT TGGACTGCTA CAACCAGAAA CCCTTACTT  
 801 AGTCCGATAC TACTGTGACG AATCCATGTA ATAACGC

A continuación se detalla la alineación múltiple de las secuencias.

ORITO	-CGT-ACAACGCC--TTCATCGCCGCCACC---AACTCCTTCAGTGGGTTCGGG--ACGA	51
DOMINICO	-CGT-ACAACGCC--TTCATCGCCGCCACC---AACTCCTTCAGCGGGTTCGGG--ACTA	51
TUU-GIA	-CGT-ACAACGCC--TTCATCGCCGCCACC---AACTCCTTCAGCGGGTTCGGG--ACGA	51
CALCUTTA-4	ACGT-ACAACGCC--TTCATCGCCGCCACC---AACTCCTTCAGTGGGTTCGGG--ACGA	52
BARRAGANETE	-CGT-ACAACGCC--TTCATCGCCGCCACC---AACTCCTTCAGCGGGTTCGGG--ACTA	51
WILLIAMS	CGGTTATTACATGGATTTCGTACAGTAGTCTCGGACTAAGTAAAGGGTTCTGGTTGTAG	60

ORITO	CCGGCGACGACGCCAC-GAAGAAGA-----GGGAGATCGCGGC-TTCTTTGGCCAAACG	104
DOMINICO	CGGGCGACGACGCCAC-GAAGAAGA-----GGGAGATCGCGGC-TTCTTTGGCCAGACG	104
TUU-GIA	CGGGCGACGACGCCAC-GAAGAAGA-----GGGAGATCGCGGC-TTCTTTGGCCAGACG	104
CALCUTTA-4	CCGGCGACGACGCCAC-GAAGAAGA-----GGGAGATCGCGGC-TTCTTTGGCCAGACG	105
BARRAGANETE	CGGGCGACGACGCCAC-GAAGAAGA-----GGGAGATCGCGGC-TTCTTTGGCCAGACG	104
WILLIAMS	CAGTCCAAGTTGTCTCCGTAGCTACCCCCAGCATGTCGCAGTACTTCTTTGTAGAGCCG	120

ORITO -TCTCACGAGACGACAGGTAATTTCGTACAGCTCCCAAGGCTCGTCAACTGTTTATGGATA 163  
 DOMINICO -TCTCACGAGACGACAGGTAATTTCGTACAGCTCCCAAGGCTCGTCAACTGTTTATGGATA 163  
 TUU-GIA -TCTCACGAGACGACAGGTAATTTCGTACAGCTCCCAAGGCTCGTCAACTGTTTATGGATA 163  
 CALCUTTA-4 -TCTCACGAGACGACAGGTAATTTCGTACAGCTCCCAAGGCTCGTCAACTGTTTATGGATA 164  
 BARRAGANETE -TCTCACGAGACGACAGGTAATTTCGTACAGCTCCCAAGGCTCGTCAACTGTTTATGGATA 163  
 WILLIAMS ATCCTATCCGCCACCCTGGAAT-CGGACCCTTCCCGCACTC--CAACCCTCCATTGATG 177

ORITO GAGA-GCTGAATGCATGA-GGTTTGGCAGGT---GGGTGGCCGA-CGGCGCCCGATGGC 216  
 DOMINICO GAGA-GCTGAATGCATGA-GGTTTGGCAGGT---GGGTGGCCGA-CGGCGCCCGATGGC 216  
 TUU-GIA GAGA-GCTGAATGCATGA-GGTTTGGCAGGT---GGGTGGTTCGA-CGGCGCCCGATGGC 216  
 CALCUTTA-4 GAGA-GCTGAATGCATGA-GGTTTGGCAGGT---GGGTGGTTCGA-CGGCGCCCGATGGT 217  
 BARRAGANETE GAGA-GCTGAATGCATGA-GGTTTGGCAGGT---GGGTGGTTCGA-CGACGCCGGCTGAC 216  
 WILLIAMS ATGTTGGTGATGACACCGTAGCCCGGAAGCCTTCCGGCCCGCGGTGGCGTTGGATGGC 237

ORITO --CCG---TACGCGTGGGGTACTGCTTCATCAGTGAACGGAAACCCCAAGGACTACT 271  
 DOMINICO --CCG---TACGCGTGGGGTACTGCTTCATCAGTGAACGGAAACCCCAAGGACTACT 271  
 TUU-GIA --CCG---TACGCGTGGGGTACTGCTTCGTCAGGAAACAGAAACCCCTCATCGACTACT 271  
 CALCUTTA-4 --CCG---TACGCGTGGGGTACTGCTTCGTCAGGAAACAGAAACCCCTCATCGACTACT 272  
 BARRAGANETE --CCCCCTTCGGGGGGACTGCTGCTTCCTCGATGAGAAGACCCCCNAGTACTGCG 274  
 WILLIAMS GTCCA-----GCTCCCGTTATCACGTCGT-----GGCACGCGGCTGGGCCACTGAG 286

ORITO GCGTCGCC--AACTCGCAGTGGCCGTGCGCTGCAGGCAAGAAATACTACGGCCGGGGCC 329  
 DOMINICO GCGTCGCC--AACTCGCAGTGGCCGTGCGCTGCAGGCAAGAAATACTACGGCCGGGGCC 329  
 TUU-GIA GCGTCGCC--AGCTCGCAGTGGCCGTGCGCTGCAGGCAAGAAATACTACGGCCGGGGCC 329  
 CALCUTTA-4 GCGTCGCC--AGCTCGCAGTGGCCGTGCGCTGCAGGCAAGAAATACTACGGCCGGGGCC 330  
 BARRAGANETE GCGTCACC--TCCTCTTGGCGCCGTCTGCTGCN----- 306  
 WILLIAMS GAGTCATCCAGAACCACAG-AGCCGTCT--TGAAGG----AGATGGTCGGTTCGGTGGCC 339

ORITO CATCCAAATCTCA-TAGTAAGCCATACTTTTACAGTTCATCGC---CGCGATCGAGTTCA 385  
 DOMINICO CATCCAAATCTCA-TAGTAAGCCATACTTTTACAGTTCATCGC---TGCATCGAGTTCA 385  
 TUU-GIA CATCCAAATCTCA-TTGTAAAGCCATACTTTTACAGTTCATCGC---CGCGATCGAGTTCA 385  
 CALCUTTA-4 CATCCAAATCTCA-TTGTAAAGCCATACTTTTACAGTTCATCGC---CGCGATCGAGTTCA 386  
 BARRAGANETE ---TTAA----- 310  
 WILLIAMS A--CCAGTCTGGGTTGTTGAGCAGG---TCGGAGCCGATGGCTCTCCGGCCG-GCCCC 393

ORITO CAACGATGGCCTTTCTA-ACGCA--ACA-ATCCGATGTGTCTGCGTGCAGCAA--CTAC 439  
 DOMINICO CAACGATGGCCTTTCTA-ACGCA--ACA-ATCCGATGTGTCTGCGTGCAGCAA--CTAC 439  
 TUU-GIA CAACGATGGCCTTTCTA-ACGCA--ACA-ATCCGATGTGTCTGCGTGCAGCAA--CTAC 439  
 CALCUTTA-4 CAACGATGGCCTTTCTA-ACGCA--ACA-ATCCGATGTGTCTGCGTGCAGCAA--CTAC 440  
 BARRAGANETE ----- 440  
 WILLIAMS TAGTTGTAG--TTGCTGCACGCAGAACACATCGGAT-TGT--TGCCT-TAGAAAGGCCAT 447

ORITO AACTACGGGC-CGGCCGGGA----GAGCCATCGGC-TCCGACCTGCTCAACAACCCAGAC 493  
 DOMINICO AACTACGGGC-CGGCCGGGA----AAGCCATCGGC-TCCGACCTACTCAAGAACCCAGAC 493  
 TUU-GIA AACTACGGGC-CGGCCGGGA----GAGCCATCGGC-TCCGACCTGCTCAACAACCCAGAC 493  
 CALCUTTA-4 AACTACGGGC-CGGCCGGGA----GAGCCATCGGC-TCCGACCTGCTCAACAACCCAGAC 494  
 BARRAGANETE ----- 494  
 WILLIAMS CGTTGTGAACCTCGATCGCGCGATGAACTGTAAGAGTATGGCTTACAATGAGATTTGGA- 506

ORITO CTGGTGGCCACCGACGCGAC-CATCT--CGTTCAAG--ACGGCT-CTGTGGTTCTGGATG 547  
 DOMINICO CTGGTGGCCACCGACGCGAC-CATCT--CCTTCAAG--ACGGCT-CTGTGGTTCTGGATG 547  
 TUU-GIA CTGGTGGCCACCGACGCGAC-CATCT--CCTTCAAG--ACGGCT-CTGTGGTTCTGGATG 547  
 CALCUTTA-4 CTGGTGGCCACCGACGCGAC-CATCT--CGTTCAAG--ACGGCT-CTGTGGTTCTGGATG 548  
 BARRAGANETE ----- 548  
 WILLIAMS -TGG-GGCCTCGGCCGTAGTACTTCTTGCCTGCACGCGACGGCCACTGCGA----GCTG 559

ORITO ACTCCTCAGTCGCCAA---GCCGTCGTGCC-----ACGACGTGATAACCGGGAG-GTGG 598  
 DOMINICO ACTACTCAGTCGCCAA---GCCGTCGTGCC-----ACGACGTGATAACCGGGAG-TTGG 598  
 TUU-GIA ACTCCTCAGTCGCCAA---GCCGTCGTGCC-----ACGACGTGATAACCGGGAG-CTGG 598  
 CALCUTTA-4 ACTGCTCAGTCGCCAA---GCCGTCGTGCC-----ACGACGTGATAACCGGGAG-GTGG 599  
 BARRAGANETE ----- 599  
 WILLIAMS GCGACGCAGTAGTCCGATGAGGGGTTCTGTTCTGGACGAAGCAGTAACCCACGCGTAC 619

ORITO	ACGCCATCCAACGCCGACCAGGCGGCCGGAAGGCTTCCGGGCTACGGTGTCAACCAAC	658
DOMINICO	AAGCCAACCAACGCCGACCAGGCGGCCGGAAGGCTTCCGGGCTACGGTGTCAACCAAC	658
TUU-GIA	ACGCCATCCAACGCCGACCAGGCGGCCGGAAGGCTTCCGGGCTACGGTGTCAACCAAC	658
CALCUTTA-4	ACGCCACCAACGCCGACCAGGCGGCCGGAAGGCTTCCGGGCTACGGNGTCACCACCNAC	659
BARRAGANETE	-----	
WILLIAMS	GGGCCATCGGGCGCG-TGACCACCAC----CTGCCAAACC-CAATGCATTAGCT-C	672
ORITO	ATCATCAATGGAGGGTTGG--AGTGCGGGAAGGGTAC-GATGCCAGGGTGGCGGATAGG	715
DOMINICO	ATCATCAATGGAGGGTTGG--AGTGCGGGAAGGGTCC-GATTCCAGGGTGGCGGATAGG	715
TUU-GIA	ATCATCAATGGAGGGTTGG--AGTGCGGGAAGGGTCC-GATGCCAGGGTGGCGGATAGG	715
CALCUTTA-4	ATCATCAATGGAGGGTTGT-AGTGCGGGAAGGGTCCCGATGCCNGGGTGGCGGATAGG	718
BARRAGANETE	-----	
WILLIAMS	TCTATCCATAAACTGTTGACGAGCCTCGGAGATGTACGAATTACCTGTCGTCTCGTGAG	732
ORITO	ATCGGCTTCTACAGGAGGTACTGCGACTTGTCTGGGGTGAGCTACGGAGACAACCTGGAC	775
DOMINICO	ATCGGCTTCTACAGAAGTACTGCGACTTGTCTGGGGTGAGCTACGGAGACAACCTGGAC	775
TUU-GIA	ATCGGCTTCTACAGGAGGTACTGCGACTTGTCTGGGGTGAGCTACGGAGACAACCTGGAC	775
CALCUTTA-4	ATCGGCTTCTACANNAGGTACNGNACTTGTCTG-----	751
BARRAGANETE	-----	
WILLIAMS	A-CGTCTGCGCCAAGAAA-GCCGCGATCTCC-----TCTTCTTCGTGG----CGTCGTC	781
ORITO	TGCTACAACCAGAGACCCTTTGCTTCTACAGCAGCTACAGCCACATTTAGCGGTGAGCT	835
DOMINICO	TGCTACAACCAGAAACCCCTTT-----	796
TUU-GIA	TGCTACAACCAGAGTCCCTTT-----	796
CALCUTTA-4	-----	
BARRAGANETE	-----	
WILLIAMS	GCCCGTAGTCCCGAACCCGCTG-----	803
ORITO	ATGGAGACAACCTGGNCTGCTACAACCAGAGACCCTTTACTTCTGTCGGATACTACTGTGA	895
DOMINICO	-----ACTTAGTCCGATACTACTGTGA	818
TUU-GIA	-----ACTTAGTCCGATACTACTGTGA	818
CALCUTTA-4	-----	
BARRAGANETE	-----	
WILLIAMS	-----AAGGAGTTGG---CGGCGGCGA	822
ORITO	CGAATCCATGTAATAACGCAAGGG	919
DOMINICO	CGAATCCATGTAATAACGC-----	837
TUU-GIA	CGAATCCATGTAATAACGC-----	837
CALCUTTA-4	-----	
BARRAGANETE	-----	
WILLIAMS	TGAAAG-GCGTTGTA-CG-----	838



**FIGURA 4.26.** Agrupación de variedades de banano y plátano según la diferencia que existen en la secuencia del ADN con genes de quitinasa usando el programa Clustal Phylogenetic.

También hubo diferencia en las secuencias de ADN de 'Calcutta-4', 'Tuu Gia', 'Williams', 'Orito', 'Barraganete' y 'Dominico' con genes análogos de resistencia (FIGURA 4.27).

A continuación se detallada la secuencia de cada una de las variedades.

### **'CALCUTTA-4'**

```

1 TACTTCCTGG TGCTGGACGA CATCTGGAAC GAGGACAGCG TGAATGGGC
51 AAGATTTTGT GCACCATTGA GGTACGGAGA ACCAGGAAGC AAGATTTTGA
101 TTACAACCTCG CTCTAAAAAT ATTGCAGACA TGGTTGGCAA TCCGTTCCCT
151 CTAGATGGTC TGGATGACGC CAGCTATTGG GAATTTTCA AGCAATGTGC
201 ATTTGGTTCC GAATACGCTG GTGAATGTCC ACAGCTAGAA GTCATAGCAG
251 AGAAGATCGC TGGCAGGTTG AAGGGGTTGC CACTTGCGGC AAGGACGGTA
301 GGCGGGTTGT TGAAGACGCA GATGAATGAG GAGCACTGGA GAATCATCGC
351 AGGGAGTGAA ATATGGCAAC TACCGCAAAA CCAAGAGGGT GTCCTGCCAG
401 TCCTACAACCT GAGCTATCAT TGTCTTCCCT CACACCTTAA GCGGTGTTTT
451 GTTTTTGTGTT CCATGTTCCC CAAAGATCAT CTGTTTAATA AACGGGACTT
501 GAGCCGGCTT TGGATGGCAG AAGGCTGCGC TGCTCAAGAC AACAACATGA
551 CGTTGGAGGA TGCAGGAAGC CGCTACTTCG ATGAGTTAGC GAACAGGTCT
601 TTCTTTATGG AAGCTCCTCG GGGATCGGAT TTTGTGGTGC ATGATATTGT
651 GCACGACTTG GCCG

```

**'TUU-GIA'**

1 TACTTCCTGG TGCTGGACGA CGTGTGGGAT GCTCGGATCT GGGACGACTT  
51 GCTCCGCAAT CCTTGCAGG GAGGAGCAGC AGGCAGCAGG GTGCTGGTGA  
151 GAGATGAAGC TGCTGCCTCC GGAGGATGGC TGGTCGCTCC TGTGCAAGAA  
201 GCGCAGCATG AATGCAGAGG AGGAAAGGGA TGCCCAAGAT CTCAAGGACA  
251 CAGGCATGAA GATTGTTGAC AAATGCGGAG GGCTTCCCCT GGCCTTCAAG  
301 ACCATCGGAG GGGTCCTCTG CTCCCGAGGA CTCAACAAAA ATGCGTGGGA  
351 GGAAGTTCTC CGCANCGCCG CATGGTCACG GACCGGGCTT CCCGAAGGTG  
401 TGCACGGACC ACTGTATCTG AGCTNCCAAG ATCTCCCGTC TCATCTCAAG  
451 CAATGCTTTC TCTACTGCGC CTTGTTCTT CAAGATTTGG AGTTTCTCAG  
501 GCCTCAAATC GTCGAATTAT GGATAGCCGA NGGGTTTGTC TAGGCACGAG  
551 GAGATGTCAC GTTGAAGGAA ACAGGGGAGC AATATCGTAA AGAGCTGCTT  
601 CATCGGAGCC TTATACANTT GCNACGTTAC GATCTGGA CTACGATGAGTC  
651 TTTCATGATG CACGACCTTG TGCACGACTT GNCCNAN

**'WILLIAMS'**

1 TACTTCCTGG TGCTGGATGA CGTGTGGAGC TTAGGGCTGG CGGTGCTGGA  
51 GCTGCACCGG GGACACTTCC CGTTGCTCCC TAAGGGGGCG CGGCTGGACT  
101 GGGCGGCGCT GATGGTGGTG ATTTGCTTCG GGGAGGCGGC TAGGGCTGTG  
151 CCGGAGGGGG CAGCGTCTAG CGAGTTCCGG GGGTTCCTAG ATTGCTGCCT  
201 GCAGAAGGAG AGCAGGAAGC GGTGGTCGGT GGCAGA ACTC CTGGGCCACC  
251 CCTTCGTGGC CGCGGATTAC CGGGCTGAGT CAGAGAAGGC GCTGCACGAC  
301 CTGGTGCACG ACTTGGCCGA AGGGCGAATT CCAGCACACT GCGGCGCTT  
351 ACTAGTGGAT CCGAGCTCGG TACCAAGCTT GGCCTAATCA TGGTCATAGC  
401 TGTTTCTGT GTGAAATTGT TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA  
451 GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT  
501 CACATTAATT GCGTTGCGCT CACTGCCCGC TTTCCAGTCG GGAAACCTGT  
551 CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG  
601 CGTATTGGGC GCT

**'ORITO'**

1 TACTTCCTGG TGCTGGATGA CGTGTGGAGG TACTTCCTGG TGCTGCACGA  
51 CCTTGTGCAC GACTTGGCCG AAGGGCGAAT TCCAGCACAC TGGCGGCCGT  
101 TACTAGTGGA TCCGAGCTCG GTACCAAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG  
151 CTGTTTCCTG TGTGAAATTG TTATCCGCTC ACAATTCCAC ACAACTTACG  
201 AGCCGGAAGC ATAAAGTGGA AAGCCNGGNC TGTCTAATGA GTGAGCTAAC  
251 TCACATTAAT TGC GTTGC GC TC ACTGCCCG CTTTCCAGTC GGCAAACCTG  
301 CCGTGCCTTT TGCATTATG AATCGCCNTA CTCCTCTGGA GAGGCG

**'BARRAGANETE'**

1 CGGCCAAGTC GTGCACCAGG TCGTGCACCG TGAACACGTA CGTCTGGTTC  
51 CACACGTCAT CCAGCACCCAG GAAGTACCTC AAGGGCGAAT TCCAGCACAC  
101 TGGCGGCCGT TACTAGTGGA TCCGAGCTCG GTACCAAGCT TGGCGTAATC  
151 ATGGTCATAG CTGTTTCCTG TGTGAAATTG TTATCCGCTC ACAATTCCAC  
201 ACAACATACG AGCCGGAAGC ATAAAGTGTA AAGCCTGGGG TGCCTAATGA  
251 GTGAGCTAAC TCACATTAAT TGC GTTGC GC TC ACTGCCCG CTTTCCAGTC  
301 GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA CGCGCGGGGA  
351 GAGGCGGTTT GCGTATTGGG CGCT

## 'DOMINICO'

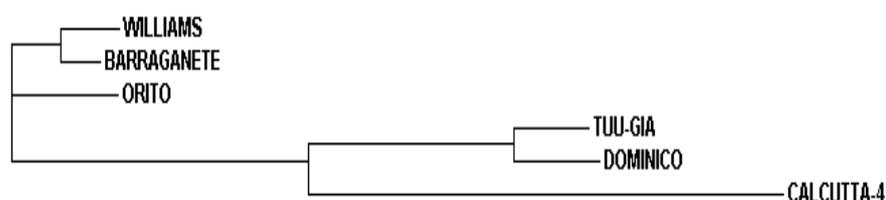
1 TACTTCCTGG TGCTGGATGA CGTGTGGGAT GCTCATATCT GGGACGACTT  
 51 GCTCCGCAAT CCTTTGCAGG GAGGAGCAGC AGGCAGCAGG GTGCTGGTGA  
 101 CCACCAGAAA CGCAGGGATC GCGAGGCAAAA TGAAGGCGGC CCACGTCCAC  
 151 GAGATGAAGC TGCTGCCTCC GGAGGACGGC TGGTCCCTCC TGTGCAAGAA  
 201 GGCGACGATG AATGCAGAGG AGGAAATTGA TGCCCAAGAT CTCAAGGACA  
 251 CAGGCATGAA GATTGTTGGG AAATGCGGAG GGCTTCCCCT GGCCATCAAG  
 301 ACCATCGGAG GGGTCCTCCT CGATAGAGGA CTCACAGAA GTGCGTGGGA  
 351 GGAAGTTCTC CGCAGCGCCG CATGGTCACG GACCGGGCTT CCCGAAGGTG  
 401 TGCACGGAGC ACTGTATCTG AGCTACCAAG ACTTGCCGTC ACATCTCAAG  
 451 CAATGCTTTC TCTACTGTGC CTTGTTCCAA GAAAATATG TGTTTCGTAG  
 501 GCCTACCATC GTCAGATTAT GGATAGCCGA GGGGTTTGTC GAAGCCCAG  
 551 GAGATGTCAG CTTGGAGGAA ACAGGGGAGC AATATTACAA AGAGCTGCTT  
 601 CGTAGGAGCC TTCTAAAATC GCAACCTTAC GGTCTGGACT ACGATGAGCC  
 651 TTCCAAGATG CATGATCTTA TGCACGACTT GGCCG

A continuación se detalla la alineación múltiple de las secuencias.

WILLIAMS	TACTTCCTGGTGTGGATGACGTGTGGA-----GCTTAGGGCTGGCGGTGCT----	47
BARRAGANETE	-----CGGCCAAGTC-----	10
ORITO	TACTTC-----CT----	8
TUU-GIA	TACTTCCTGGTGTGGACGACGTGTGGGAT-----GCTCGGATCTGGGACGACTTGCT	53
DOMINICO	TACTTCCTGGTGTGGATGACGTGTGGGAT-----GCTCATATCTGGGACGACTTGCT	53
CALCUTTA-4	TACTTCCTGGTGTGGACGACATCTGGAACGAGGACAGCGTGAATGGGCAAGATTTTGT	60
WILLIAMS	-----GGA-GCTGCACCGGGGAC--ACTTCCCGTTGCTCCCTAAGGGGG	88
BARRAGANETE	-----G-----TGACCAGG-----TCGT-----	24
ORITO	-----G-----GTGCTGGA-----TGACGT-----	23
TUU-GIA	CCGCAATCCTTTGCAGGGA-GGAGCAGCAGGAGCAGGGTGTGGTGA-----	100
DOMINICO	CCGCAATCCTTTGCAGGGA-GGAGCAGCAGGAGCAGGGTGTGGTGAACCCAGAAACG	112
CALCUTTA-4	GCACCATTG----AGGTACGGGAACCCAGGAAGCAAGATTTTAGTTACAACCTCGCTCTA	115
WILLIAMS	CGCGGCTGGACTGGGCGGCGCTGATGGTGGTATTGCTTCGGG-----GAGGCGGCTA	142
BARRAGANETE	-----GCACCGTG-----AACACG--TA	40
ORITO	-----GTG-----GAGGTA----	32
TUU-GIA	-----GAGATG-----AAGCTGC----	113
DOMINICO	CAGGGATCGCGAGGCAAAATGAAGGCGGCCACGTCCACGAGATG-----AAGCTGC----	163
CALCUTTA-4	AAAATATTGCA-----GACATGGTTGGCAATCCGT----	145
WILLIAMS	GGGCTGTGCCGAGGGGGCAGCGCTAGCGA--GTTCCGGGGTTCTTAGATTGCTGCCT	200
BARRAGANETE	-----CGTCT-----GGTTCC-----	51
ORITO	-----CTTCCT-----GGTGCT-----	44
TUU-GIA	-----TGCCFCCGGA--GGATGGCTGTGCT-----CCTGT	143
DOMINICO	-----TGCCFCCGGA--GGACGGCTGGTCCCT-----CCTGT	193
CALCUTTA-4	-----TCCCTTAGATGGTCTGGATGACGCCA-----GCTA	176

WILLIAMS	GCAGAAGGAGAGCAGGAAGCGGTGGTCGGTGGCAGAACTCCTGGG---CCACCCCTTCGT	257
BARRAGANETE	-----ACAC---G---TCATCC-----	62
ORITO	-----GCAC---GA---CCTTGT-----	56
TUU-GIA	GCAAGAAGCGCAGATGAATGCAGAGGAGGAAAGGGATGCCAAG---ATCTCA-----	194
DOMINICO	GCAAGAAGCGCAGATGAATGCAGAGGAGGAAATGATGCCAAG---ATCTCA-----	244
CALCUTTA-4	TTGGGAATTTTCAAGCAATGTGCATTTGGTTCCGAATAACGCTGGTGAATGTCC---AC	232
WILLIAMS	GGCCGCGGATTACCGGGCTGAGTCAGAGAAGGCGCTGCACGACC--TGGTGCACGACTTG	315
BARRAGANETE	----AGCACCCAGG--AAGT-----ACC--TC-----	80
ORITO	-----GCAC-----GACT--TGG-----	67
TUU-GIA	-----AGGACACAGGCATGAA-----GATTGTGACAAATG-----	225
DOMINICO	-----AGGACACAGGCATGAA-----GATTGTGAGGAAATG-----	275
CALCUTTA-4	AGCTAGAAGTCAATAGCAGAGAA-----GATCGCTGGCAGGTTG----	270
WILLIAMS	GCCGAAGGGC-----GAATCCAGCACACTGGCGG---CCGTTAC--TAGTGGATCC	362
BARRAGANETE	----AAGGGC-----GAATCCAGCACACTGGCGG---CCGTTAC--TAGTGGATCC	123
ORITO	--CCGAAGGGC-----GAATCCAGCACACTGGCGG---CCGTTAC--TAGTGGATCC	113
TUU-GIA	--CGGAGGGCTTCCCTGGCCTTCAAGACCATCGGAGGGGTCTCTGCTCCCAGGACTC	283
DOMINICO	--CGGAGGGCTTCCCTGGCCTTCAAGACCATCGGAGGGGTCTCTCTGATAGAGACTC	333
CALCUTTA-4	---AAGGGTTGCCACTTGGCGCAAGGACGGTAGGCGGG--TTGTTAAGACGCAGAT--323	
WILLIAMS	GA-----GCTCGGTACCAAGCTTGGC--GTAAT---CATGGTCATAGCT-----	401
BARRAGANETE	GA-----GCTCGGTACCAAGCTTGGC--GTAAT---CATGGTCATAGCT-----	162
ORITO	GA-----GCTCGGTACCAAGCTTGGC--GTAAT---CATGGTCATAGCT-----	152
TUU-GIA	AACAAAAATGCGTGGGAGGAAGTTCTCC--GCANCGCCGATGGTCACGGACC-----	334
DOMINICO	AACAGAAATGCGTGGGAGGAAGTTCTCC--GCAGCCCGCATGGTCACGGACC-----	384
CALCUTTA-4	GAATGAGGAGCACTGGAG-AATCATCGCAGGAGTGAATATGGCAACTACCGCAAAACC	382
WILLIAMS	-----GTTTCCTG-----TGTGAA-----ATTGTTATCCG-----	426
BARRAGANETE	-----GTTTCCTG-----TGTGAA-----ATTGTTATCCG-----	187
ORITO	-----GTTTCCTG-----TGTGAA-----ATTGTTATCCG-----	177
TUU-GIA	----GGGCTTCCCGAAG--TGTGCACGGACCACTGT-ATCTGAGCTNCCAAGATCTCC	386
DOMINICO	----GGGCTTCCCGAAG--TGTGCACGGAGCACTGT-ATCTGAGCTACCAAGACTTGC	436
CALCUTTA-4	AAGAGGGTGTCTTGCAGTCCACAACTGAGCTATCATTTGCTT-----C	427
WILLIAMS	-----CTCA--CAAT-----TCCAC-----ACAACA-TACGAGC--C	453
BARRAGANETE	-----CTCA--CAAT-----TCCAC-----ACAACA-TACGAGC--C	214
ORITO	-----CTCA--CAAT-----TCCAC-----ACAACA-TACGAGC--C	204
TUU-GIA	CGTCTCATCTCAAGCAATGCTTTCCTACTGCGCCTTGTTCCTCAAGATTTGGAGTTTC	446
DOMINICO	CGTCACATCTCAAGCAATGCTTTCCTACTGTGCCTTGTTCCTCAAGAAACTATGTGTTTC	496
CALCUTTA-4	CCTCACACCTTAAGCGTGTGTTTGTGTTTTGTTCCATGTTCCCAAGATCATCTGTTTA	487
WILLIAMS	GGAAGCATAAAGT-----GTAAGCCTGGGG---TGCCCTAA---TGAGTGAGCT	496
BARRAGANETE	GGAAGCATAAAGT-----GTAAGCCTGGGG---TGCCCTAA---TGAGTGAGCT	257
ORITO	GGAAGCATAAAGT-----GTAAGCCTGGGG---TGCTTAA---TGAGTGAGCT	247
TUU-GIA	TCAGGCCTCAAAATCGTCGAATTATGGATAGCCGANGGGTTTGTCTAGGCACGAG-GAGAT	505
DOMINICO	GTAGGCCTACCATCGTCAGATTATGGATAGCCGANGGGTTTGTTCGAAGCCCGAG-GAGAT	555
CALCUTTA-4	ATAAACGGGACTTGAGCCGGCTTTGGATGGCAGAAGG--TCGCGTG-CTCAAGACAACA	544
WILLIAMS	AACTCACATT-----AATTGCGTTGCGCTCACTGC-----CCGCTTCCAGTCGGG--	542
BARRAGANETE	AACTCACATT-----AATTGCGTTGCGCTCACTGC-----CCGCTTCCAGTCGGG--	303
ORITO	AACTCACATT-----AATTGCGTTGCGCTCACTGC-----CCGCTTCCAGTCGGG--	293
TUU-GIA	G--TCAGCTTGAAGGAAACAGGGAGCAAT-ATCGTAAAGAGCTGCTTC---ATCGGAGC	559
DOMINICO	G--TCAGCTTGGAGGAAACAGGGAGCAAT-ATTACAAAGAGCTGCTTC---GTAGGAGC	609
CALCUTTA-4	ACATGACGTTGGAGGATGCAGGAAGCCGCT-ACTTCGA----TGAGTT---AGCGAA--	593
WILLIAMS	----AAACCTGTCG---TGCCAGCTGCATTA--AT-GAATCGGCCAACGCGGGGAGA	591
BARRAGANETE	----AAACCTGTCG---TGCCAGCTGCATTA--AT-GAATCGGCCAACGCGGGGAGA	352
ORITO	----AAACCTGTCG---TGCCCTTTGCATTC--AT-GAATCGCCNACTCTCTGGAGA	342
TUU-GIA	CTTATACANTTGCNACGTTACGATCTGGACTACGAT-GAGTCTTTCATGATGCACG---A	615
DOMINICO	CTTCTAAAATCGAACCTTACGGTCTGGACTACGAT-GAGCCTTCCAAGATGCATG---A	665
CALCUTTA-4	----CAGGCTTTCTTTATGGAAGCTCCTCGGGGATCGGAT--TTGTGGTGCATG---A	644

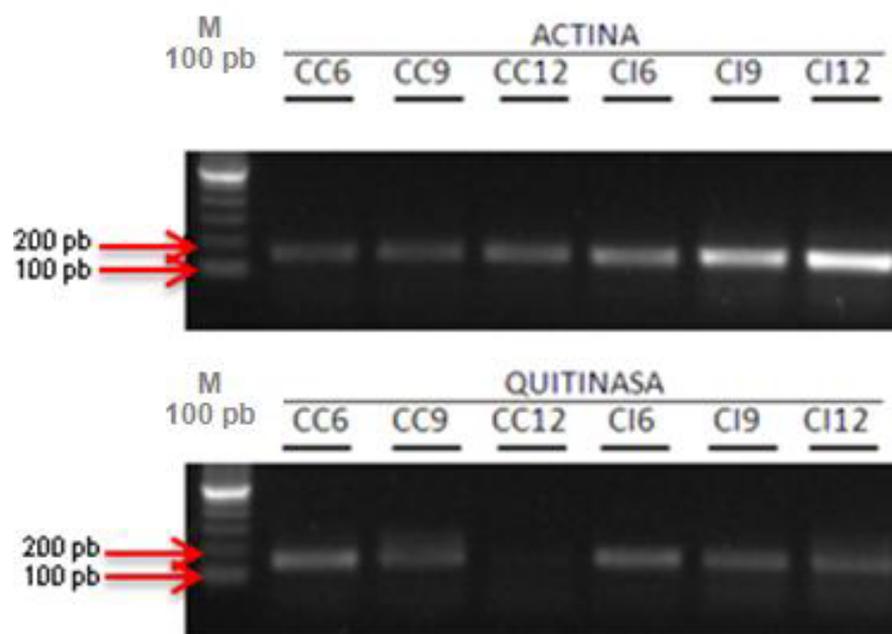
WILLIAMS	GGCGGTTTGCCTATTGGGCGCT	613
BARRAGANETE	GGCGGTTTGCCTATTGGGCGCT	374
ORITO	GGCG-----	346
TUU-GIA	CCTTGTGCACGACTTGNNCNAN	637
DOMINICO	TCTTATGCACGACTTGGCCG--	685
CALCUTTA-4	TATTGTGCACGACTTGGCCG--	664



**FIGURA 4.27.** Agrupación de variedades de banano y plátano según la diferencia que existen en la secuencia del ADN con genes análogos de resistencia usando el programa Clustal Phylogenetic.

### 4.3. Expresión génica de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad.

En la variedad 'Calcutta-4' (resistente a Sigatoka negra) el gen de quitinasa se expresó normalmente cuando está inoculado con *M. fijiensis* a los seis, nueve y doce días, pero también cuando no está inoculado con el patógeno excepto para el día doce después de la aplicación (FIGURAS 4.28).



**FIGURA 4.28. Expresión de gen de actina y quitinasa en 'Calcutta-4'.** RT-PCR para determinar expresión del gen quitinasa en 'Calcutta-4' a los seis (CI6), nueve (CI9) y doce (CI12) días de haber sido inoculado con *M. fijiensis* en condiciones controladas. CC6, CC9 y CC12 se refiere a días después de haber sido aplicado el gel sin conidias de *M. fijiensis*. M Marcador.

# CAPÍTULO 5

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

### 5.1. CONCLUSIONES.

1. Los genes de quitinasa y análogos de resistencia están presentes en algunas variedades de banano y plátano, que pueden ser resistentes, tolerables o susceptibles a la Sigatoka negra en banano.
2. El gen de quitinasa se expresa en la variedad 'Calcutta-4' de forma basal y cuando se inocula con *M. fijiensis*.

## 5.2. RECOMENDACIONES.

1. Confirmar la expresión de los genes encontrados en las variedades estudiadas en bioensayos con inoculaciones controladas de *M. fijiensis*.
2. Realizar pruebas de transformación genética para sobreexpresar los genes de quitinasa y análogos de resistencia para determinar si confieren resistencia a la Sigatoka negra en variedades susceptibles a la enfermedad.

# APÉNDICES

## APÉNDICE 1

### EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE HOJAS DE BANANO

Combinación de los Protocolos de Extracción de ADN de DellaPorta *et al* y Aljanabi, *et al*. (73, 74). Modificados por Santos (76).

1. Tomar un gramo de hoja de invernadero o *in Vitro*.
2. Colocar la hoja en un mortero y triturlarla con ayuda de nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo muy fino, transferir el polvo a un tubo de 50 ml.
3. Añadir 4 ml de buffer de extracción
  - 100 mM Tris – HCl, PH 8
  - 50 mM EDTA
  - 500 mM B – Mercaptoetanol
  - 2 % PVP (Polivinil Pyrrolidone)
4. Añadir SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) a una concentración final de 2% e incubar por 10 minutos a 55 ° C.
5. Añadir 1.300 ul 5 M de Acetato de Potasio, mezclar el contenido del tubo en un vortex, centrifugar durante 10 minutos a 12.000 RPM.
6. Recolectar la mayor cantidad posible de sobrenadante, evitando recolectar el pellet.
7. Añadir 3 ml de Cloruro de Sodio 6 M y vortex por 30 segundos a la mayor velocidad.
8. Centrifugar 10 minutos a 12.000 RPM y recolectar el sobrenadante.

9. Añadir RNAasa (a una concentración final de 200 ug/ml) al sobrenadante e incubar a 37 °C por 15 minutos.
10. Centrifugar a 12.000 RPM por 10 minutos y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo resistente a cloroformo.
11. Añadir igual volumen de Cloroformo: Isoamilalcohol con una pipeta de vidrio e invertir los tubos, centrifugar a 12.000 RPM por 5 minutos y transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo, este paso puede ser repetido.
12. Añadir igual volumen de Isopropanol al sobrenadante, mezclar bien e incubar las muestras a – 20 °C por 30 minutos (o menos a menor temperatura) el protocolo puede ser parado aquí y las muestras pueden ser almacenadas en el congelador.
13. Centrifugar a 12.000 RPM por 20 minutos.
14. Lavar el pellet con etanol al 70 % y dejar secar brevemente.  
Disolver el pellet en 0,4 – 1 ml de agua estéril.

## Bibliografía

- (1) FAOSTAT, Food and Agricultural Organization of the United Nations Statistical Databases, ProdSTAT, Crops - Bananas, plantains - World Production, 2009. <http://faostat.fao.org/> (último acceso, Marzo de 2011).
- (2) Guillerbenis Vega Torres, La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el plátano, 2002. <http://www.monografias.com/trabajos33/sigatoka-negra/sigatoka-negra.shtml> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (3) IACA, Cadena Agroindustrial del Plátano, Febrero 2009, Pág. 5.
- (4) Gonzalo Betancourt, La "SIGATOKA NEGRA" del Banano y el Plátano, 2008. [http://www.infoagro.net/shared/docs/a3/4Sigatoka\\_negra.pdf](http://www.infoagro.net/shared/docs/a3/4Sigatoka_negra.pdf) (último acceso, Diciembre de 2010).
- (5) José Leonel Vargas Reyes, Antecedentes del banano, 2010. <http://www.monografias.com/trabajos73/antecedentes-banano-platano/antecedentes-banano-platano.shtml> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (6) Aguirre, M; Castaño, J y Zuluaga, L., Método rápido de diagnóstico de *Mycosphaerella musicola* leach y *M. fijiensis* morelet, agentes causantes de las Sigatokas amarilla y negra, Rev. Acad. Colomb. Ciencias, 2003, 27(105): 619-623.

- (7) Galileo Rivas y Franklin Rosales, Inibap. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos, 2003, Pág. 14. [http://www.musalit.org/pdf/IN050064\\_es.pdf](http://www.musalit.org/pdf/IN050064_es.pdf) (último acceso, Diciembre de 2010).
- (8) Nakyanzi, M., Molecular and pathogenic diversity of isolates of *Mycosphaerella fijiensis* that cause black Sigatoka disease of bananas in East Africa, Thesis PhD. University of Greenwich, Resources Institute, 2002, Pág. 2.
- (9) FAO, La economía mundial del banano, Avances Tecnológicos, 2009. <http://www.fao.org/docrep/007/y5102s/y5102s07.htm> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (10) APSnet, Sigatoka negra bananeros y plátaneros, 2010. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/BlackSigatokaEspanol.aspx> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (11) Schmelzer, E., Cell polarization, a crucial process in fungal defence, Trends Plant Science, 2002, 7: 411-415.
- (12) Melchers, L.S. and Stuver, M.H., Novel genes for disease resistance breeding, Curr. Opin, Plant Biol, 2000, 3: 147–152.
- (13) Dangl, J. L., Jones, J.D.G., Plant pathogens and integrated defense responses to infection, Nature, 2001, 411: 826-833.
- (14) Kasprzewska, A., Plant chitinases – regulation and function, Cell Mol Biol Lett, 2003, 8: 809 – 824.
- (15) Lay, F.T. and Anderson, M.A., Defensins – Components of the Innate Immune System in Plants, Current Protein and Peptide Science, 2005, 6: 85-101.

- (16) Dangl, J. L., Jones, J.D.G., Plant pathogens and integrated defense responses to infection, 2001, *Nature* 411: Pág.826-833.
- (17) Juge, N., Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes, *Trands in Plant Science*, 2006, 11: 359-67.
- (18) Pieterse, C.M.J., Ton, J and Van Loon, L.C., Cross-talk between plant defence signalling pathways: boost or burden, *AgBiotechNet* 2001, 3: 1-7.
- (19) Beveraggi, A., Mourichon, X., et Sallé, G., Étude compare des premières étapes de l'infection chez des bananiers sensibles et résistants inféctés par *Cercospora fijiensi* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladies des raies noires, *Canadian Journal of Botany*, 1995, 73: 1328-1337.
- (20) Ortiz, R., and Vuylsteke, D., Inheritance of black sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa* spp.) hybrids, *Theoretical and Applied Genetic*, 1994, 89: 146-152.
- (21) Lepoivre, P., Acuna, P., and Riveros, A.S., Screening procedure for improving resistance to banana black leaf streak disease, pp. 213-220. In: J. Ganry (ed.). *Breeding Bananas for Resistance to Disease and Pests*. CIRAD/INIBAP, Montpellier, France, 393 p.
- (22) Quinones, W., Escobar, G., Echeverri, F., Torres, F., Rosero, Y., Arango, V., Cordana, G., and Gallego, A., Synthesis and antifungal activity of *Musa* Phytoalexins and structural analogs, *Molecules*, 2000, 5: 978-980.
- (23) Hoss, R., Helbig, J., and Bochow, H., Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp. – *Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopathology*, 2000, 148:387-394.

- (24) Inibap, Producción y Comercialización de Banano Orgánico en la Región del Alto Beni, Manual práctico para productores, 2010, Pág. 32-33.
- (25) Grupo Latino Editores Ltda., Control de plagas y enfermedades en los cultivos, 2007, Pág. 184-185.
- (26) Romero, R. A.: «Black Leaf Streak, Control», Diseases of banana, Abaca, and Enset, CABI Publishing, Wallingford, Inglaterra, 2000, pp. 72-79.
- (27) Pérez, L.; F. Mauri; A. Hernández; E. Abreu; A. Porras: «Epidemiología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba, I Pronóstico bioclimático de los tratamientos en bananos (*Musa acuminata* AAA)», Revista Mexicana de Fitopatología, 2000, 18 (1):15-26.
- (28) Robert, C. F.; A. López; R. H. Fulton: «Quantitative Modifications in Banana Field Surveys to Improve Spray Timing and Control of Black Sigatoka *Mycosphaerella fijiensis* var. *diiformis*», Abstracts of the 74<sup>th</sup>, Annual Meeting APS, Phytopathology, 1982, 72:987.
- (29) Fouré, E.; A. Molium Pefoura; X. Mourichon: «Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Cameroun, Caractérisation de la résistance au champ des bananiers appartenant a divers groupes génétiques», Fruits, 1990, 45:339-345.
- (30) Romero, R. A.: «Black Leaf Streak, Control», Diseases of banana, Abaca, and Enset, CABI Publishing, Wallingford, Inglaterra, 2000, pp. 72-79.

- (31) Luis Pérez Vicente, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, MANEJO CONVENCIONAL Y ALTERNATIVO DE LA SIGATOKA NEGRA EN BANANOS: ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS, FITOSANIDAD vol. 10, no. 1, marzo 2006. Pág. 56. <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/2091/209116158009.pdf> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (32) Jimenez, Effect of the nutritional status of banana (*Musa spp.*) on leaf disease infestation by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in Ecuador, Dissertaciones de Agricultura, Ph.D. thesis. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium, Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen, 2008, 138 .p
- (33) Vandesteene L., De Clercq D., Coosemans J., and Ryckeboer J., The ability of composts to induce systemic resistance against rootrot in *Spathiphyllum* plants, *Parasitica*, 2003, 59(3-4), 75-85.
- (34) Ghorbani R., Wilcockson S., Koocheki A., and Leifert C., Soil management for sustainable crop disease control: a review, *Environmental Chemical Letters*, 2008. <http://profdoc.um.ac.ir/paper-abstract-1005504.html> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (35) Krause M.S., De Ceuster T.J., Tiquia S.M., Michel Jr.F.C., Madden L.V., and Hoitink H.A.J., Isolation and characterization of rhizobacteria from composts that suppress the severity of bacterial leaf spot of radish, *Phytopathology*, 2003, 93:1292-1300.
- (36) Héctor Calle, Inibap, Estrategias de manejo para Sigatoka negra en Ecuador, 2010, Pág. 29.
- (37) Mario Orozco-Santos, Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos, *Tropical Plant Pathology*, vol. 33, 2008, 3: 189-196, Pág. 192.
- (38) Phil Rowe, Mejoramiento de banano y plátano resistentes a plagas y enfermedades, 1998, Pág. 56 - 62.

- (39) Swennen R, Arinaitwe G, Cammue BPA, François I, Panis B, Remy S, Sági L, Santos E, Strosse H, Van den houwe I, Transgenic approaches for resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases in *Musa* spp, 2003. Jacome L, Lepoivre P, Marin D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (ed.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas, San José, Costa Rica, INIBAP, Montpellier, France, 20-23 May 2002, 209-238.
- (40) X. Mourichon, J. Carlier y E., Fouré, Enfermedades de Musa, Hoja Divulgativa N° 8, 1997, Pág. 3 - 4. [http://www.musalit.org/pdf/IN980040\\_es.pdf](http://www.musalit.org/pdf/IN980040_es.pdf) (último acceso, Diciembre de 2010).
- (41) Kodjo Tomekpé, Christophe Jenny y Jean-Vincent Escalant, InfoMusa, Análisis de las estrategias de mejoramiento convencional de Musa, Vol. 13 No.2, 1999, Pág. 1 - 5.
- (42) Cruz, HA., Producción de embriones somáticos transformados de mango y aguacate, Tesis Ph.D. Irapuato, Guanajuato, MX, CINVESTAV, 1998, 80p.
- (43) Crouch, HJ; Vuylsteke, D; Ortiz, R., Perspectives on application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp), Electronic Journal of Biotechnology, Vol 1, 1998. <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v1n1/art02.pdf> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (44) Vuylsteke, D; Hartman, J; Tenkouano, A., Breeders' perspective on biotechnology for Musa improvement, INFOMUSA, 1999, 8(1):6-7.
- (45) Sági L., Genetic engineering of Banana for disease resistance – Future Possibilities., In: Diseases of Banana, Abacá and Enset. D.R. Jones, editor, CAB International, Wallingford, UK, 1999, pp. 465-515.

- (46) Ecociencia y Ministerio del Ambiente, Material de Consulta. Desenredando las complejidades, Organismos genéticamente modificados y bioseguridad, Programa de Conservación de la Biodiversidad, el Páramo y otros Ecosistemas frágiles del Ecuador, Ecociencia – Embajada de Holanda y Proyecto Implementación del Marco Nacional de Bioseguridad PNUMA-GEF-MAE, Quito, 2007. <http://www.flacsoandes.org/biblio/catalog/resGet.php?resId=46535> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (47) OMBRINK E. y I. SOMSSICH, Defense responses of plants to pathogens, *Adv. Bot. Res.*, 1995, 21:1-34.
- (48) VAN LOON L., Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins, En: *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, Eds. S. K. Datta y S. Muthukrishnan, CRC Press, Boca Raton, USA, Cap. 1, 1999, pp. 1-19.
- (49) PUNJA Z., Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens - a review of progress and future prospects, *Can. J. Plant Pathol*, 2001, 23:216-35.
- (50) Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC: Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:11746-11750.
- (51) Aarts MG, te Lintel HB, Holub EB, Beynon JL, Stiekema WJ, Pereira A: Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*, *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11:251-258.
- (52) Leister RT, Katagiri F: A resistance gene product of the nucleotide binding site -- leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo, *Plant*, 2000, 22:345-354.
- (53) Bertoli DJ, Leal-Bertoli SC, Lion MB, Santos VL, Pappas G Jr., Cannon SB, Guimaraes PM: A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*, *Mol Genet Genomics*, 2003, 270:34-45.

- (54) Robert NG Miller, David J Bertioli, Franc C Baurens, Candice MR Santos, Paulo C Alves, Natalia F Martins , Roberto C Togawa, Manoel T Souza Júnior and Georgios J Pappas Júnior, Analysis of non-TIR NBS LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping, Miller et al., 2008, Pág. 3.
- (55) MELCHERS L. y M. STUIVER, Novel genes for disease- resistance breeding, *Curr, Opin, Plant Biol*, 2000, 3:147-52.
- (56) Schlumbaum, A., Mauch, A., Vogeli, U. and Boller, T., Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth, *Nature*, 1986, 324:365-367.
- (57) Geoffrey Arinaitwe, An Improved Agrobacterium-Mediated Transformation Method for Banana and Plantain (*Musa spp.*), 2008, Pág. 36.
- (58) Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., and Mass, C., Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco, *Plant J.*, 1995, 8: 97-109.
- (59) Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J., and Broglie, R., Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, 1991, 254: 1194-1197.
- (60) Nishizawa, Y., Nishio, Z., Nakazono, K., Soma, M., Nakajima, E., Ugaki, M. and Hibi, T., Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase, *Theor. Appl. Genet.*, 1999, 99:383-390.
- (61) Broglie, R. and Broglie, K., Chitinase gene expression in transgenic plants: A molecular approach to understanding plant defence responses, *Trans. R. SOC. Lond, B*, 1993, 342:265-270.

- (62) SHAH D., Genetic engineering for fungal and bacterial diseases, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997, 8:208-14.
- (63) LASSNER M. y J. BEDBROOK, Directed molecular evolution in plant improvement, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2001, 4:152-6.
- (64) LAWTON M., Recognition and signaling in plantpathogen interactions: implications for genetic engineering, En: *Genetic Engineering*, vol. 19, Ed. J. Setlew, Plenum Press, USA, 1997, pp. 271-93.
- (65) Angenieux C., Fricker D., Strub J., Luche S., Hanau D., de la Salle H., Rabilloud T., *Funct. Integr. Genomics*, 2001, 1: 323-329.
- (66) YODER, O., Toxins in pathogenesis, *Annu. Rev. Plant Pathol.*, 1980, 18:103-29.
- (67) DAUB M., Tissue culture and the selection of resistance to pathogens, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1986, 24:159-86.
- (68) Van Diemen P M et al., Characterization of a resource population of pigs screened for resistance to salmonellosis, 2002. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=13889248> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (69) Pei X, Li S, Jiang Y, Zhang Y, Wang Z, Jia S: Isolation, characterization and phylogenetic analysis of the resistance gene analogues (RGAs) in banana (*Musa* spp.), *Plant Sci* 2007, 172:1166-1174.
- (70) Wiame L, Swennen R, Sagi L: PCR-based cloning of candidate disease resistance genes from banana (*Musa acuminata*), *Acta Hort*, 2000, 521:51-57.

- (71) Peraza-Echeverria S, James-Kay A, Canto-Canche B, Castillo-Castro E: Structural and phylogenetic analysis of Pto-type disease resistance gene candidates in banana, *Mol Genet Genomics*, 2007, 278:443-453.
- (72) Mohamad A, Heslop-Harrison JS: Genomes, diversity and resistance gene analogs in Musa species, *Cytogenet Genome Res*, 2008 in press. <http://www.mendeley.com/research/genomes-diversity-resistance-gene-analogues-musa-species/> (último acceso, Diciembre de 2010).
- (73) DELLAPORTA SL, WOOD J, HICKS JB, A plant DNA minipreparation: version II, *Plant Molecular Biology Reports*, 1983, 1: 19-21.
- (74) Aljanabi, S. Martinez, I., Universal and rapid salt – extraction of high quality genomic DNA for PCR – based techniques, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25. Pp. 4692 – 4693.
- (75) Jiménez M, Van der Veken I, Neiryneck H, Rodriguez H, Ruiz O, Swennen R, Organic banana production in Ecuador: its implications on black Sigatoka development and plant-soil nutritional status, *Renew Agric Food Syst*, 2007, 22: 297-306.
- (76) Santos, E. Characterization and isolation of T-DNA tagged banana promoters active during in vitro regeneration and low temperature stress, *Dissertationes de agricultura*, Ph.D. thesis 787, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen, 2008, P. 188.