

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FCA**  
Facultad de  
Ciencias Agropecuarias

**Departamento de Biología**

## **TRABAJO DE DIPLOMA**

**Título** Efecto del ácido jasmónico, etefón y benztidiazol exógeno en la respuesta del cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*) a la Sigatoka negra

**Autores** Sandra Pérez Peláez

**Tutores** Lic. Orelvis Portal Villafaña, Dr. C.

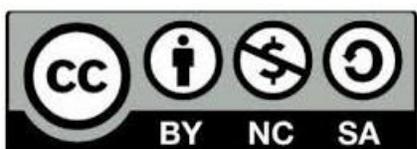
Lic. María I. Oloriz Ortega, Dra. C.

Santa Clara, junio, 2018  
Copyright©UCLV

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

**Atribución- No Comercial- Compartir Igual**



Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830

Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

## **Resumen**

Los bananos y los plátanos (*Musa* spp.) constituyen uno de los alimentos más importantes a nivel mundial, con una producción anual de aproximadamente 144 000 000 t (FAOSTAT, 2014). La Sigatoka negra causada por el ascomicete *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton constituye la enfermedad foliar más devastadora que afecta a los bananos y plátanos. En cultivares susceptibles como 'Grande naine' generalmente la expresión de genes relacionados con la defensa se expresan en etapas tardías de la interacción con *P. fijiensis*. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la aplicación exógena de fitohormonas relacionadas con la defensa en plantas en la interacción *P. fijiensis*-'Grande naine' y analizar la inducción de genes que codifican para las proteínas PR en el tratamiento con la fitohormona de mejor respuesta frente a la Sigatoka negra. En este sentido se evaluó el efecto del ácido jasmónico (JA), etefón (ET), benzotiadiazol (BTH), así como de los inhibidores de la ruta de biosíntesis del JA (el ácido salicilhidroxiaminico) y del ET (el ácido aminooxicético), en el índice de infección. También se analizó la expresión de genes que codifican para proteínas PR en el tratamiento de la fitohormona de mejor respuesta en la disminución del índice de infección. El tratamiento con JA resultó ser el que más disminuyó el índice de infección siempre que la ruta del etileno esté activada. Además, se comprobó que la aplicación exógena de JA induce la expresión temprana de genes relacionados con la ruta de biosíntesis del JA y las proteínas PR en el cv. 'Grande naine' frente a la Sigatoka negra.

**Palabras clave:** bananos y plátanos, fitohormonas, proteínas PR, *Pseudocercospora fijiensis*

## **Abstract**

Black Sigatoka caused by the ascomycete *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton is the most devastating foliar disease that affects bananas and plantains. In susceptible cultivars such as 'Grande naine' the expression of defense-related genes is generally expressed in late stages of the interaction with *P. fijiensis*. The objective of this study was to determine the effect of the exogenous application of defense-related phytohormones in plants in the interaction *P. fijiensis*-'Grande naine' and analyze the induction of genes that code for PR proteins in the treatment with the phytohormone of better response to black Sigatoka. In this sense, the effect of jasmonic acid (JA), ethephon (ET), benzothiadiazole (BTH), as well as inhibitors of the JA biosynthesis pathway (salicylhydroxyminic acid) and ET (aminooxyacetic acid), were evaluated in the disease index. We also analyzed the expression of genes that code for PR proteins in the treatment of the phytohormone of better response in the decrease of the disease index. Treatment with JA decreased the most the infection index as long as the ethylene route is activated. In addition, it was proved that the exogenous application of JA induces the early expression of genes related to the biosynthesis pathway of JA and PR proteins in cv. 'Grande naine' in front of black Sigatoka.

**Keywords:** bananas and plantains, phytohormones, PR proteins, *Pseudocercospora fijiensis*

## Índice

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	4
2.1. <i>Musa</i> spp.	4
2.1.1. Origen, distribución mundial y taxonomía	4
2.1.2. Morfología	4
2.1.3. Importancia económica	5
2.1.4. Principales enfermedades	5
2.2. Sigatoka negra	7
2.2.1. Agente causal	7
2.2.2. Ciclo de la enfermedad	8
2.2.3. Sintomatología	9
2.2.4. Medidas de control	10
2.3. Interacción <i>Pseudocercospora fijiensis</i> - <i>Musa</i> spp.	13
2.3.1. Mecanismos de defensa de las plantas	13
2.3.2. Tipos de interacción	15
Fitohormonas	16
Proteínas PR	18
2.3.3. Genes expresados durante la interacción	22
3. Materiales y métodos	26
3.1. Efecto del ácido jasmónico, etefón y benzotiadiazol exógeno en el desarrollo de la Sigatoka negra en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ ( <i>Musa</i> AAA)	26
Cultivo de <i>P. fijiensis</i> .	26
Propagación de las plantas	27
Aplicación exógena de fitohormonas e inhibidores	27
Análisis estadístico	
3.2. Expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ ( <i>Musa</i> AAA) tratado con la hormona de mejor respuesta frente a la Sigatoka negra	28
Extracción de ARN y síntesis de ADNc	28
Análisis mediante PCR	30

4. Resultados y discusión	32
4.1. Efecto del ácido jasmónico, etefón y benzotiadiazol exógeno en el desarrollo de la Sigatoka negra en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ ( <i>Musa AAA</i> )	31
4.2. Expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ ( <i>Musa AAA</i> ) tratado con la hormona de mejor respuesta frente a la Sigatoka negra	38
5. Conclusiones	43
6. Recomendaciones	44
7. Referencias bibliográficas	

## 1. Introducción

Los bananos y los plátanos (*Musa* spp.) constituyen uno de los alimentos más importantes a nivel mundial. Estos crecen en las regiones tropicales y subtropicales, y abarcan aproximadamente 120 países, con una producción anual de al menos 144 000 000 t (FAOSTAT, 2014). En estas condiciones de cultivo se ven afectados por varias enfermedades, las cuales pueden causar grandes pérdidas. La Sigatoka negra constituye la enfermedad foliar de mayor importancia, la cual es causada por el hongo ascomicete *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (Marín *et al.*, 2003, Churchill, 2011). Las plantas infectadas muestran un rango de síntomas en dependencia de los niveles de resistencia de cada cultivar. Algunos de estos síntomas son necrosis foliar, reducción del área fotosintética y maduración prematura de los frutos. Dada la susceptibilidad de cultivares de *Musa* se ha requerido el uso frecuente de múltiples funguicidas. Esto resulta altamente perjudicial tanto para el medio ambiente como para las personas que trabajan y viven en estas áreas (Ploetz, 2001).

*P. fijiensis* tiene un estilo de vida hemibiotrófico, y como tal, es capaz de producir y secretar efectores para suprimir las respuestas de defensa de la planta. Dentro de su mecanismo de acción está tanto prevenir la muerte celular del hospedante para llevar a cabo su fase biotrófica como producir metabolitos secundarios tóxicos y proteínas para inducir la muerte de los tejidos en su fase necrotrófica (Stergiopoulos *et al.*, 2013).

El sistema inmune innato de las plantas actúa de dos formas fundamentales; la primera responde a moléculas comunes de muchas clases de microorganismos patógenos y no patógenos y la segunda responde directamente a factores de avirulencia de los patógenos o a sus efectores en el hospedante (Jones y Dangl, 2006). Se han ampliado los conocimientos acerca del sistema inmune en las plantas con la identificación de algunos receptores que reconocen la presencia del patógeno y con la caracterización de rutas de señalización que conectan el reconocimiento del patógeno con la activación de la respuesta de defensa (Ojito-Ramos y Portal, 2010).

También, se han identificado moléculas de pequeño tamaño como el ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno, que constituyen fitohormonas y desempeñan funciones importantes en la planta. Además, estas fitohormonas, así como algunos de sus análogos (*e.g.* benzotiadiazol (BTH)) o precursores sintéticos (*e.g.* etefón (ET)) son también conocidos por mediar las respuestas de defensa de las plantas frente al estrés biótico y abiótico (Verma *et al.*,

2016). Se conoce que las rutas de señalización de estas fitohormonas se conectan entre ellas para regular los diferentes mecanismos de respuesta, actuando entre ellas sinérgica o antagónicamente en dependencia del tipo de estrés (Bari y Jones, 2009).

Entre los mecanismos de defensa que tienen las plantas se encuentra la inducción de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), que posean actividad antimicrobiana reconocida (van Loon *et al.*, 2006). Por tanto, la inducción de algunas PR proteínas ante la infección por un microorganismo puede sugerir la participación de estas en la defensa de la planta (Ferreira *et al.*, 2007). Estas proteínas también son inducidas en respuesta a varios factores medioambientales que pueden producir estrés en las plantas como la salinidad, metales pesados, tratamiento con determinados compuestos, daño mecánico y sequía (Yu *et al.*, 2001). Según Portal *et al.* (2011), en la interacción compatible *P. fijiensis*-‘Grande naine’, las rutas del etileno y del JA se activan en etapas avanzadas de la enfermedad. Esto corresponde con la fase necrotrófica del ciclo de vida del hongo. Además, en este estudio el análisis por PCR cuantitativo reveló la expresión de genes, incluyendo los que codifican para algunas proteínas PR, solamente a los 30 días posteriores a la inoculación (dpi) (Portal *et al.*, 2011).

Acorde a la problemática anterior, nos proponemos la siguiente hipótesis:

La aplicación exógena de fitohormonas podría mejorar la respuesta de plantas de banano cultivar ‘Grande naine’ a la Sigatoka negra y la inducción de genes que codifican para proteínas PR.

### **Objetivo general**

Determinar el efecto de la aplicación exógena de ácido jasmónico, etefón y benzotiazol en la respuesta de defensa del cultivar ‘Grande naine’ (*Musa AAA*) frente a *Pseudocercospora fijiensis*.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto del ácido jasmónico, etefón y benzotiazol exógeno en el desarrollo de la Sigatoka negra en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ (*Musa AAA*).

2. Analizar la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la patogenicidad en el cultivar susceptible 'Grande naine' (*Musa* AAA) luego del tratamiento con la hormona de mejor respuesta frente a la Sigatoka negra.

## **2. Revisión bibliográfica**

### **2.1. *Musa* spp.**

#### **2.1.1. Origen, distribución mundial y taxonomía**

El género *Musa* tiene su centro de origen en el sudoeste de Asia, en un área localizada entre la India, Papúa, Nueva Guinea y varias islas del Pacífico. Los bananos y plátanos son los nombres comunes con los que se conoce a las especies comestibles de este género. Estas plantas están presentes en más de 100 regiones tropicales y subtropicales de Asia, África, América y Australia (Marín *et al.*, 2003). Por constituir una fuente importante de carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales, este cultivo contribuye grandemente a la alimentación y nutrición de los países más pobres (Castañeda *et al.*, 2017).

*Ensete*, *Musa* y *Musella* son los tres géneros que pertenecen a la familia *Musaceae*, orden *Zingiberales*. Cheesman (1947) dividió el género *Musa* en cuatro secciones (*Australimusa*, *Callimusa*, *Eumusa* y *Rhodochlamys*) basándose en el número de cromosomas y en las características morfológicas. Luego, Argent (1976) propone incluir una nueva sección denominada *Ingentimusa* para clasificar a las especies de *Musa* que se han informado con diferentes números de cromosomas. Wong *et al.* (2002) realizaron un estudio utilizando AFLP (del inglés: *Amplified Fragment Length Polymorphism*) para evaluar si las diferencias genéticas entre estas plantas justifican verdaderamente la separación en estas cuatro secciones. De acuerdo con los resultados que obtuvo, propuso la reducción del género *Musa* de cuatro secciones a dos, agrupando *Rhodochlamys* con *Eumusa* y *Australimusa* con *Callimusa* (Wong *et al.*, 2002, Langhe *et al.*, 2009).

#### **2.1.2. Morfología**

Las especies del género *Musa* son hierbas perennes que pueden alcanzar de 2-8 m de altura, en dependencia de las condiciones ambientales. Las variedades comestibles no presentan semillas, se reproducen mediante un rizoma subterráneo, del cual se origina el pseudotallo formado por las vainas foliares. Las hojas son erguidas, oblongas, pueden alcanzar hasta 2 m de largo por 55 cm de ancho, redondeadas en el ápice y en la base, con un total de 35-50 hojas por planta. Las inflorescencias se producen de 7-9 meses después de la plantación, miden hasta 1,5 m de largo y poseen brácteas violáceas. Los frutos son partenocárpicos, crecen en

racimos que contienen 30-70 unidades, con un periodo de maduración entre 3-4 meses (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007).

No existen características botánicas para diferenciar los plátanos y bananos. De forma general, los plátanos tienen más almidón en los frutos y se cocinan para su consumo. Por el contrario, los bananos se consumen crudos y son más dulces (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007).

### **2.1.3. Importancia económica**

Los plátanos y bananos son muy utilizados en la alimentación humana, estando entre los 10 cultivos de mayor importancia a nivel mundial. El principal productor es la India, con alrededor de 29 000 t anuales. Por su parte, Ecuador es el principal exportador, al comercializar el 82% de su producción (FAOSTAT, 2016).

Estas plantas tienen también otras implicaciones económicas importantes en diferentes áreas de la industria. En este sentido, los bananos han sido utilizados para la producción de alcohol, donde se reconocen como cultivos de alto rendimiento (Guevara *et al.*, 2012). Además, por su alto contenido de compuestos químicos como aminos biogénicos (la dopamina y la serotonina), vitaminas (A, E, K, C y B) y minerales como el potasio que es un componente importante en la regulación de la presión sanguínea, son utilizados ampliamente en la industria farmacéutica (R.Granda *et al.*, 2005). Algunas especies, como *Musa textilis* Neé, se utilizan para la confección de ropas a partir de las fibras obtenidas del pseudotallo. También, en la industria papelera se emplean en la elaboración de bolsas de té, filtros de cigarrillos y papel de impresión de alta calidad (Roux *et al.*, 2008).

En Cuba, los plátanos y bananos constituyen cultivos de elevada prioridad dentro del programa alimentario nacional, dada la posibilidad de su producción todos los meses del año, su elevado potencial productivo, el arraigado hábito de consumo y la diversidad de usos. Estas producciones se basan fundamentalmente en los subgrupos Cavendish (AAA), Plantain (AAB, ABB) y tetraploides (AAAA, AAAB, AABB) (Martínez y González, 2007).

### **2.1.4. Principales enfermedades**

Debido a las condiciones de cultivo de alta humedad y altas temperaturas, los plátanos y bananos se ven afectados por una gran variedad de enfermedades, las cuales pueden causar grandes pérdidas económicas. La enfermedad de la Sigatoka es considerada a nivel mundial

como la enfermedad foliar más devastadora que afecta al género *Musa* (Arzanlou *et al.*, 2008) ya que constituyen los hospedantes primarios de *Pseudocercospora fijiensis*. La especie de planta ornamental *Heliconia psittacorum* L. f. es conocida por ser hospedante alternativo de este hongo (Gasparotto *et al.*, 2005). *P. fijiensis*, *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton y *Pseudocercospora eumusae* Crous y Mourichon son los agentes causales de la Sigatoka negra, de la Sigatoka amarilla y de la mancha foliar por eumusae, respectivamente (Crous y Mourichon, 2002, Crous *et al.*, 2016). Este complejo de enfermedades afecta la capacidad fotosintética de las hojas y con esto la reducción y maduración prematura de los frutos (Donzelli y Churchill, 2007). Las tres especies de hongo son morfológicamente muy similares y frecuentemente coexisten en la misma lesión (Arzanlou *et al.*, 2008).

Otra de las enfermedades más destructivas en bananos es la marchitez por *Fusarium* causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) W.C. Snyder y H.N. Hansen (*Foc*) (Nel *et al.*, 2006). Este hongo habita en el suelo, donde infecta a las plantas a través de las raíces e invade los tejidos de conducción del agua. Esto conlleva a que se bloqueen los vasos conductores y ocurra marchitamiento, necrosis, caída de las hojas y puede llevar a la muerte del hospedante (Rawal, 1996). Basado en la especificidad de *P. fijiensis* por el hospedante, se reconocen cuatro razas: raza 1, patogénica para ‘Gros Michel’ (AAA) y ‘Silk’ (AAB); raza 2, patogénica para ‘Bluggoe’ (AAB); raza 3, patogénica solo en *Heliconia* spp. y raza 4, que afecta al grupo Cavendish y a los cultivares susceptibles a las razas 1 y 2. La raza 4 se encuentra dividida en subtropical y tropical. Se considera a esta última como la más letal (Fourie *et al.*, 2011).

La enfermedad del Moko o marchitamiento bacteriano causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith) ocasiona síntomas similares a la marchitez por *Fusarium* y es transmitida a la planta por insectos (Stover, 1972). Después de la Sigatoka negra, esta enfermedad constituye uno de los problemas fitosanitarios más limitantes en la producción de plátanos y bananos en América Latina y el Caribe.

El virus *Banana bunchy top virus* (BBTV) es transmitido por áfidos (Magee, 1953). Los síntomas consisten en un rayado negro de los nervios en la porción inferior de las hojas y en el tallo. Cuando la enfermedad progresa, las hojas disminuyen el tamaño. Por otra parte, el *Banana streak virus* (BSV) induce rayas cloróticas y necróticas como síntomas característicos. Este virus es transmitido por cochinillas (Helliot *et al.*, 2002).

*Radopholus similis* (Cobb) Thorne es el agente causal de la pudrición del sistema radical (Montiel *et al.*, 1997). Tanto los individuos adultos como las larvas de estos nematodos debilitan el sistema radical de las plantas (Stover, 1972). Otros endoparásitos como los nematodos *Helicotylenchus multicinctus* (Cobb) Golden y *Pratylenchus coffeae* Goodey ocasionan síntomas similares (Talwana *et al.*, 2006).

## **2.2. Sigatoka negra**

### **2.2.1. Agente causal**

La Sigatoka negra es causada por el hongo ascomicete *Pseudocercospora fijiensis*, perteneciente a la familia *Mycosphaerelleaceae*, orden *Capnodiales* y clase *Dothideomycetes*. *P. fijiensis* es un hongo haploide, hemibiotrófico y heterotálico (Churchill, 2011). La fase asexual de *P. fijiensis* está relacionada con la formación de conidios en el interior de los conidióforos, que emergen principalmente por la superficie abaxial de la hoja. Se presenta en lesiones jóvenes y se asocia con la diseminación del hongo a cortas distancias (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005). La fase sexual, de mayor importancia en el desarrollo de la enfermedad, se produce en lesiones maduras, en estructuras denominadas pseudotecios, en cuyo interior se encuentran las ascosporas. En periodos de alta humedad, las ascosporas se liberan al ambiente y las corrientes de aire las dispersan a largas distancias (Nelson, 2008).

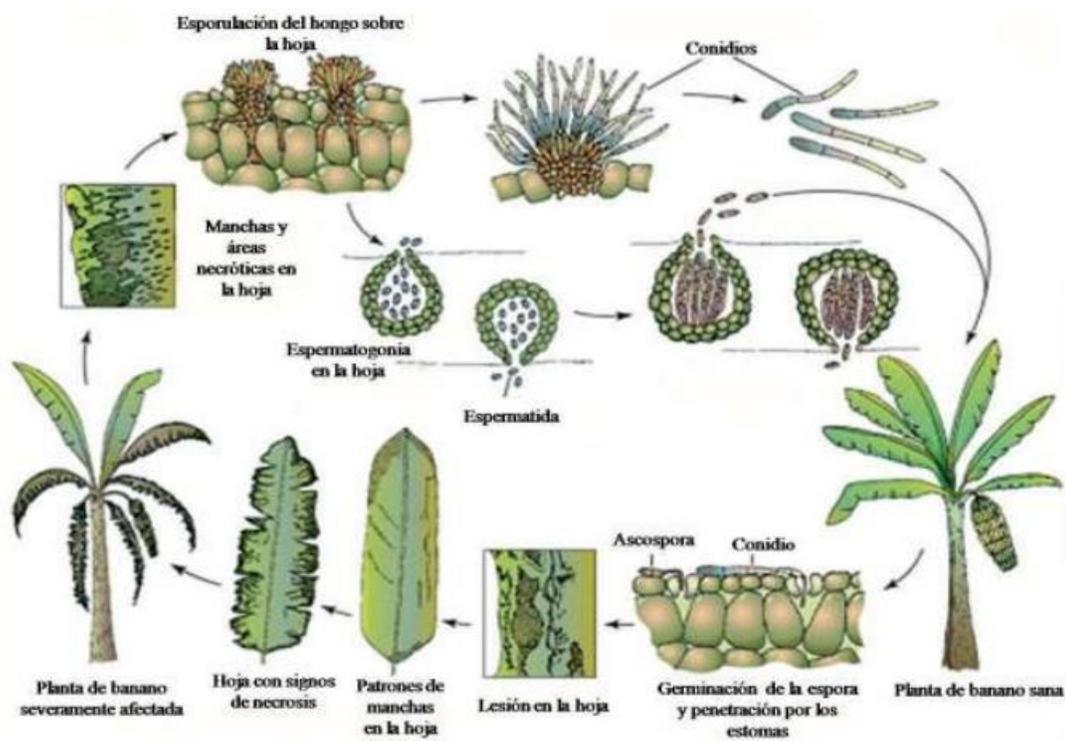
*P. fijiensis* se identificó inicialmente en las islas Fiji, en el Pacífico sur en el año 1963 (Stover, 1978). Tiempo después, en la década de 1960, fue conocido por ser más virulento que *Pseudocercospora musae* (Ploetz *et al.*, 2003). *P. fijiensis* se ha esparcido a la mayor parte de las regiones en todo el mundo donde se cultivan especies del género *Musa*. Con este esparcimiento, *P. fijiensis* demuestra una alta capacidad de adaptación a los climas fríos (Carlier *et al.*, 2000, Gauhl *et al.*, 2000, Arzanlou *et al.*, 2007).

*P. fijiensis* tiene un alto nivel de diversidad genética ocasionada por su reproducción sexual y ciclo de vida corto, que ocasiona numerosas generaciones por año y un elevado índice de recombinación genética. Estas características del patógeno dificultan su control, el cual se basa principalmente en el uso de fungicidas. Sin embargo, esta medida de control provoca contaminación al ambiente, problemas a la salud humana y genera resistencia en hongo a estos fungicidas (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

### 2.2.2. Ciclo de la enfermedad

El ciclo de la enfermedad consta de cuatro etapas que incluyen la germinación de las esporas, la penetración en el hospedante, el desarrollo de los síntomas y la producción de las esporas (Agrios, 2005). La infección ocurre primeramente en las hojas más jóvenes y los síntomas se desarrollan siguiendo un gradiente de evolución desde el ápice hasta la base (Bellaire *et al.*, 2010) (Figura 1).

La infección puede ocurrir tanto por los conidios como por las ascosporas. Estas últimas germinan en la superficie de la hoja. Se produce un crecimiento epifítico del tubo germinativo, el cual penetra a través de los estomas y prolifera en el espacio intercelular (Nelson, 2008). Las hifas de *P. fijiensis*, una vez dentro de la planta, colonizan las células adyacentes por un periodo de siete días. El hongo emerge por los estomas, crece sobre la superficie de la hoja y vuelve a penetrar por otros estomas o produce conidióforos. Este crecimiento epifítico permite una mayor dispersión del hongo, lo cual contribuye al rápido desarrollo de los síntomas (Marín *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Pseudocercospora fijiensis*. Modificado de Churchill (2011).

Las ascosporas están comúnmente en las hojas más adultas de la planta o en las hojas muertas caídas (Marín *et al.*, 2003). Estas emergen de las hojas luego de periodos de humedad y son dispersadas por el aire a unos pocos cientos de kilómetros debido a su susceptibilidad a las radiaciones UV. Los conidios se producen en menor cantidad y son dispersados por la lluvia. En este sentido juegan un papel importante en el esparcimiento en condiciones de alta humedad (Marín *et al.*, 2003).

El patógeno establece una relación biotrófica durante 3-4 semanas después de la penetración por los estomas antes de la aparición de síntomas necróticos. El desarrollo de la enfermedad es favorecido cuando existe alta humedad y abundantes precipitaciones, mientras que las temperaturas menores de 20 °C y períodos secos inhiben el crecimiento del hongo (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005).

### **2.2.3. Sintomatología**

El período de incubación de la enfermedad es el tiempo que transcurre entre el momento de la infección y la aparición del primer síntoma en la superficie abaxial de la hoja. Este puede durar aproximadamente de 14 a 20 días (Marín *et al.*, 2003). El tiempo de evolución es el que transcurre entre la primera y la última etapa de la enfermedad (Hernández y Pérez, 2001). El período de incubación es usualmente similar en los cultivares susceptibles y resistentes, sin embargo el de evolución es diferente (Figura 2).

En condiciones de campo, la evolución de los síntomas se agrupa en seis fases: una de punto, dos de rayas y tres de manchas. El primer síntoma, que corresponde a puntos cloróticos pequeños, aparece en los 14 a 20 días de la infección (Fouré, 1985), en la superficie abaxial de la tercera o cuarta hoja completamente expandida (Bellaire *et al.*, 2010). A partir de los puntos se originan estrías de color castaño de 1 mm de ancho x 2 mm de largo y paralelas a las venas laterales de la hoja. Posteriormente, se produce un alargamiento de las estrías hasta los 20-25 mm, que se tornan marrón oscuro (Stansbury *et al.*, 2000). En el primer estado de manchas las estrías se rodean por una zona amarillo pálida. El centro de la mancha se torna negro y sufre un colapso, el borde es acuoso y se encuentra delimitado por un halo amarillo.

Finalmente, el centro de la mancha se seca volviéndose hundido o comprimido, toma una coloración gris, el borde se torna negro y se establece un área amarillo intenso entre este y el verde de la hoja (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005). El período que transcurre entre la aparición de

las manchas y el desarrollo de las rayas con los consecuentes puntos necróticos, varía en relación con el cultivar y con la severidad de la infección. Cuando la infección es llevada a cabo de forma artificial en casas de cultivo, la enfermedad se desarrolla diferente y se estableció una escala que agrupa solamente cinco etapas (Fullerton y Olsen, 1995). Dichas etapas fueron redefinidas por Alvarado-Capó *et al.* (2003).



**Figura 2.** Síntomas característicos de Sigatoka negra en plantas de *Musa* spp. en condiciones de campo (Bayer, 2007).

#### **2.2.4. Medidas de control**

El método que comúnmente se utiliza para controlar la enfermedad de la Sigatoka negra es la aplicación de fungicidas de conjunto con prácticas culturales y agronómicas. Estas incluyen la nutrición y densidad adecuada de las plantas, el drenaje apropiado y la reducción de los inóculos (Friesen, 2016).

La implementación o modificación de ciertas prácticas de cultivo pueden generar un ambiente menos favorable para la reproducción, diseminación e infección de *P. fijiensis*, y el consiguiente desarrollo de la enfermedad. Estas prácticas fitosanitarias se encuentran encaminadas a la reducción del inóculo, el control de malas hierbas, la nutrición adecuada y la correcta distribución de las plantas (Martínez *et al.*, 2011). El deshoje a intervalos semanales (Güerere-Pereira *et al.*, 2008), unido a la aplicación de urea como inhibidor de la esporulación, se encuentran entre las medidas más empleadas. La nutrición mineral balanceada es también

un aspecto relevante. Algunos elementos como el silicio, cobre, calcio, boro y zinc contribuyen a reducir la severidad de la enfermedad. (Liu *et al.*, 2014).

Los bananos y plátanos que crecen en suelos con buena fertilidad han mostrado una menor severidad de la enfermedad que las que crecen en suelos carentes de nutrientes. El manejo apropiado de la materia orgánica es esencial para una mejor producción de estos cultivos, y además puede reducir los daños causados por la enfermedad de la Sigatoka negra. Estas plantas son más afectadas por la Sigatoka negra cuando están sembrados en suelos deficientes de potasio o con un balance inapropiado de potasio y nitrógeno. De forma general, los sembrados con menos contenido de nitrógeno en el suelo muestran el doble de severidad de la enfermedad en las plantas de *Musa* spp. en comparación con los que tienen un mayor contenido del mismo. En cuanto al potasio, también existe una relación entre su aplicación y la severidad de la enfermedad. Estudios en Costa Rica han demostrado que en los sembrados que reciben menos de  $150 \text{ kg}^{-1} \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  la enfermedad se desarrolla más severamente que los que reciben entre  $150$  y  $750 \text{ kg}^{-1} \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  (Pérez-Vicente, 2012).

El riego de las plantas, así como el tiempo en que las hojas permanecen mojadas tiene influencia directa en la epidemiología de la Sigatoka negra. Las finas películas de agua que se encuentran en la superficie de las hojas son esenciales para la germinación de las esporas, para el crecimiento del tubo germinativo y para la penetración, esporulación y dispersión de *P. fijiensis*. En este sentido, el método de riego por debajo del dosel es el más recomendado (Etebu y Young-Harry, 2011, Pérez-Vicente, 2012).

El control de la Sigatoka negra se puede llevar a cabo mediante la aplicación de productos químicos como los fungicidas. Los fungicidas son agentes naturales o sintéticos que pueden proteger a las plantas de la invasión de hongos y o erradicar la infección (Hewitt, 1998). Los tratamientos se realizan mediante la aplicación alterna y en mezcla de fungicidas protectantes y sistémicos. Generalmente, los intervalos entre las aplicaciones de los fungicidas varían entre 7 y 21 días, pero en aéreas con alto índice de la enfermedad este intervalo se reduce a cada 7 y 10 días. Arias *et al.* (2003) estimaron que el costo del control de la enfermedad mediante el uso de fungicidas es de USD  $1,000 \text{ ha}^{-1}$  y tiene un significativo impacto socioeconómico. En adición, el uso de los fungicidas como forma primaria de control ha resultado en la resistencia de los hongos a estos (Ploetz, 2001, Marín *et al.*, 2003, Friesen, 2016). FRAC-Code-List. (2018), basa sus recomendaciones para el uso de fungicidas principalmente en el peligro de

crear resistencia del hongo a los fungicidas, especialmente a los sistémicos, que poseen un solo sitio de acción en el metabolismo celular del hongo a diferencia de los protectantes que tiene varios de sitios de control, lo que los vuelve más versátiles para los controles. Esto no quita que si son usados sin rotación con sistémicos, también ocasionen problemas en el equilibrio del entorno bananero (Guerrero *et al.*, 2018).

También, existe un sistema de predicción biológica para controlar la Sigatoka negra, que monitorea el desarrollo de la enfermedad con el fin de controlar la aplicación de fungicidas. Como la eficiencia de los tratamientos se basa en un fuerte efecto curativo, se prefiere el uso de fungicidas sistémicos al de fungicidas de contacto. Agregar aceite mineral al fungicida también aumenta su efecto curativo. El método, originalmente desarrollado para las manchas foliares de la Sigatoka, no es adecuado para zonas que reciben lluvia durante todo el año y funciona mejor cuando la logística y la toma de decisiones están centralizadas y en manos de especialistas.

Otra alternativa para el manejo de la enfermedad es el control biológico. Algunos estudios demuestran que las cepas de *Trichoderma* spp. tienen efectos antibióticos y micoparásitos sobre *P. fijiensis* (Alvindia, 2012), al inhibir el crecimiento del micelio del hongo a partir de la producción de glucanasas y quitinasas (Ochoa, 2002). El efecto antagonista de *Trichoderma* spp. se basa fundamentalmente, en la competencia por espacio y nutrientes en el hospedante (Arzate-Vega *et al.*, 2006). Villalta y Guzmán (2008) evaluaron el potencial de dos formulaciones de microorganismos eficaces y un aislado de *Trichoderma* spp. para el control biológico de la Sigatoka negra, lo cual demostró un alto potencial de los microorganismos eficaces para el control de esta enfermedad. Gutierrez-Monsalve *et al.* (2015) demostraron el control de la Sigatoka negra por un fungicida biológico basado en *Bacillus subtilis* EACB0015 y sus metabolitos.

El manejo de la enfermedad de la Sigatoka negra solamente mediante la aplicación de fungicidas es insostenible en el tiempo. Esto se debe a los problemas medioambientales que pueden generar y a la capacidad de adaptación de los hongos. La estrategia de control de la enfermedad más sostenible y menos dañina para el ambiente es la utilización de cultivares resistentes. Se han desarrollado cultivares de bananos y plátanos parcialmente resistentes a la Sigatoka negra. Sin embargo, estos cultivares no son bien aceptadas por los consumidores (Pérez-Vicente, 2012, Friesen, 2016). A partir de 1994, se introdujeron en Cuba algunos

cultivares desarrollados por la FHIA, con resistencia parcial a la Sigatoka negra (Pérez *et al.*, 2003). En este caso, también se requiere de mucho tiempo y espacio así como de una intensa labor de manejo.

### **2.3. Interacción *Pseudocercospora fijiensis*-*Musa* spp.**

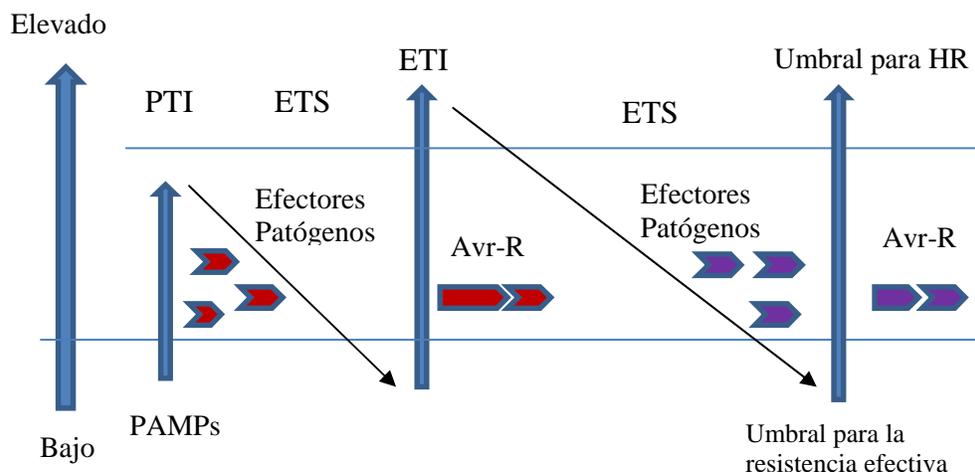
#### **2.3.1. Mecanismos de defensa de las plantas**

El sistema inmune de las plantas está constituido por una inmunidad innata que puede actuar de dos formas fundamentales. La primera está basada en el reconocimiento patrones moleculares asociados a los organismos patógenos o PAMPs (del inglés: *pathogen-associated molecular pattern*), mediante receptores de reconocimiento de patrones ubicados en la superficie de las células vegetales (PRRs, del inglés: *pattern recognition receptors*). Esta forma se denomina inmunidad activada por PAMPs o PTI (del inglés: *PAMP-triggered immunity*). Las respuestas intracelulares asociadas a la PTI incluyen una rápida difusión de iones a través de la membrana plasmática, la activación de la cascada de proteínas MAPK (del inglés: *mitogen-activated protein kinase*), la producción de especies reactivas del oxígeno, rápidos cambios en la expresión de genes y un reforzamiento de la pared celular (He *et al.*, 2007). Sin embargo, hay patógenos exitosos que producen efectores que pueden inhibir la PTI, lo cual conlleva a un periodo de susceptibilidad activada por efectores. La segunda forma de actuación de este sistema inmune, se basa precisamente en detectar estos efectores mediante otros receptores de la planta, las proteínas NB-LRR (del inglés: *nucleotide binding leucine-rich repeat*). El reconocimiento por parte de estos receptores desencadenan otras respuestas de defensa, por lo que esta forma se denomina inmunidad activada por efectores o ETI (del inglés: *effector-triggered immunity*) (Jones y Dangl, 2006, He *et al.*, 2007, Boller y He, 2009). La ETI es una respuesta acelerada y amplificada de PTI, lo que puede llevar a la resistencia a la enfermedad y casi siempre, a una respuesta de muerte celular programada en el sitio de la infección (HR) que generalmente es efectiva contra patógenos de estilo de vida biotrófico. La selección natural conduce al patógeno a evitar la ETI eliminando o diversificando el gen efector reconocido o adquiriendo otros antígenos o efectores adicionales, que les permiten evadirla. A su vez, en las plantas se adquieren a nuevas especificidades de los genes de resistencia (R), que deriva en el accionar la ETI nuevamente. Esta interacción puede ser

representada por un modelo de “zig-zag-zig” planteado por primera vez por Jones y Dangl (2006) (Figura 3).

La mayoría de las plantas saludables sintetizan metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Estos compuestos pueden existir en la planta como formas biológicamente activas o encontrarse almacenadas como precursores inactivos hasta el ataque de patógenos o daño tisular. Pasados unos minutos después del ataque por microorganismos patógenos, insectos o nematodos, las respuestas de defensa de las plantas son activadas localmente. Luego de unas horas, también se activan respuestas de defensa en otras partes de la planta, lo cual se denomina respuesta sistémica adquirida o SAR por sus siglas en inglés (Buchanan *et al.*, 2015).

Para que SAR ocurra, la infección inicial debe haber resultado en la formación de lesiones necróticas como resultado de la HR o de los síntomas propios de la enfermedad. SAR es inducida más fuertemente por a ETI que por la PTI, y durante ella son activados los genes que codifican para las proteínas PR en los tejidos distales del sitio de la infección. La activación de este tipo de resistencia puede reducir significativamente los síntomas (Ojito-Ramos y Portal, 2010, Buchanan *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Modelo de zig-zag-zig que ilustra la respuesta del sistema inmune en plantas. Modificado de Jones y Dangl (2006).

### 2.3.2. Tipos de interacción

Las plantas coexisten con una gran variedad de microorganismos patógenos, que utilizan distintas estrategias para colonizar y multiplicarse en estos tejidos. Sin embargo, solo una pequeña proporción de las interacciones planta-patógeno resultan en el desarrollo de las enfermedades. Cuando no se logra desarrollar la enfermedad, la interacción se considera compatible. Este tipo de interacción se debe fundamentalmente a que en las especies de plantas atacadas no se puede completar el ciclo de vida del patógeno. También la interacción es incompatible cuando la planta posee barreras físicas o toxinas para patógenos específicos o cuando el reconocimiento del patógeno por la planta activa mecanismos de defensa que logran combatir exitosamente la infección (Buchanan *et al.*, 2015).

Las respuestas de defensa de las plantas se clasifican en no hospedante-específicas y en hospedante-específicas. La inmunidad de las plantas frente a la mayoría de los patógenos es conocida como resistencia no hospedante-específica (Heath, 2000). En la resistencia no hospedante-específica, la inducción de los mecanismos de defensa ocurre por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a los patógenos que son moléculas características de los microorganismos. Por el contrario, para que ocurra una resistencia hospedante-específica tiene que estar presente la cepa específica del patógeno, o el cultivar específico o ambos. La resistencia no hospedante-específica normalmente brinda una protección duradera a los cultivos en el campo, mientras que la efectividad de la resistencia específica es transitoria (Heath, 2000, Thordal-Christensen, 2003).

La clasificación de los genotipos de *Musa* spp. con relación a su resistencia a la Sigatoka negra ha sido el resultado de la caracterización de las interacciones planta-patógeno. Esta interacción inicia cuando las ascosporas o conidios de *P. fijiensis* germinan y producen el tubo germinativo que penetran por los estomas (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005). De acuerdo al resultado de esta interacción, los cultivares se han clasificado 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) (Lepoivre *et al.*, 2003). La resistencia de algunas especies de *Musa* a *P. fijiensis* parece estar relacionada con la activación de un mecanismo de defensa postinfección, manifestado por la

producción de proteínas PR y algunas fitoalexinas, así como cambios en la estructura de sustancias preformadas (Hoss *et al.*, 2000, Quiñones *et al.*, 2000).

Cuando la interacción es incompatible en el patosistema *Musa* spp.-*P. fijiensis*, la planta responde rápidamente con necrosis temprana en el sitio de infección. Con esta reacción, el desarrollo de los síntomas se detienen (Alvarado-Capó *et al.*, 2003). Por otra parte, cuando la interacción es compatible ocurre el desarrollo completo de los síntomas de la Sigatoka negra. En este sentido, la velocidad con que esto ocurre depende de los diferentes cultivares y de la susceptibilidad ante la infección por *P. fijiensis* (Lepoivre *et al.*, 2003).

### **Fitohormonas**

Las fitohormonas son moléculas de pequeño tamaño que son esenciales para la regulación del crecimiento, desarrollo, reproducción y supervivencia de la planta. Actúan como mensajeros químicos y ejercen su actividad a bajas concentraciones; de modo tal, que median la respuesta adaptativa de la planta ante el estrés originado por factores bióticos y abióticos (Buchanan *et al.*, 2015).

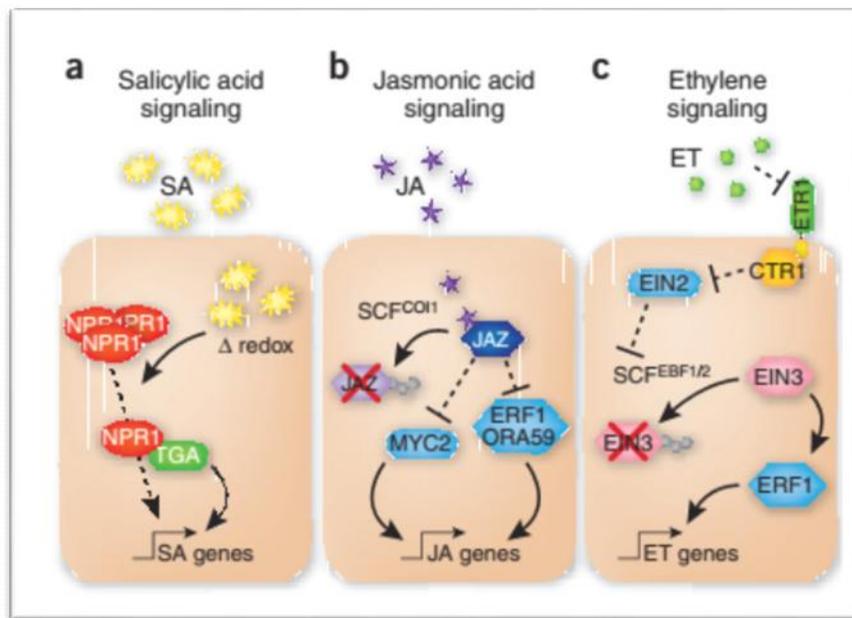
A menudo nos referimos a las cinco fitohormonas vegetales clásicas, que se identificaron en la primera mitad del siglo XX. Estas son auxinas, citoquininas, etileno, giberelinas y el ácido abscísico. Sin embargo, se han identificado otras moléculas que cumplen con los criterios de clasificación de las fitohormonas: brasinoesteroides (BR), JA, SA, y estrigolactonas.

Las moléculas antes citadas no solo desempeñan papeles importantes en la regulación de los procesos fisiológicos de la planta sino que, muchas de ellas como el SA, el JA y el etileno modulan las rutas de señalización que intervienen en los mecanismos de respuesta de la planta, ante una amplia gama de condiciones ambientales estresantes (Bari y Jones, 2009).

El SA juega un papel importante en la resistencia a enfermedades, típicamente ante patógenos de estilo de vida biotrófico (Glazebrook, 2005). La biosíntesis de SA es activada durante la PTI y la ETI luego del reconocimiento de los PAMPs o de efectores patógenos. La proteína *NONEXPRESSOR OF PR GENES1* (NPR1) actúa como reguladora de la ruta del SA y como coactivador transcripcional de genes relacionados con la defensa (Moore *et al.*, 2011). Una vez que la ruta de SA es activada por la presencia del patógeno en el sitio de la infección, se activan mecanismos de defensa en otras partes de la planta, esto constituye la resistencia sistémica adquirida (Alazem y Lin, 2015, Verma *et al.*, 2016). Por otra parte, el JA induce

resistencia contra patógenos de estilo de vida necrotrófico (Glazebrook, 2005). El etileno es un componente crítico en las respuestas ante herbívoros, daño mecánico, y ataque de patógenos, además de procesos de desarrollo como la maduración y senescencia de los frutos (Xu y Zhang, 2015).

Se conoce que las rutas de estas fitohormonas se conectan entre sí para regular los diferentes mecanismos de defensa (Figura 4). En la naturaleza las plantas se encuentran constantemente frente a estrés biótico y abiótico, y los organismos patógenos que las afectan tienen diferentes estilos de vida y estrategias de colonización. La interacción entre las rutas de las fitohormonas que median la respuesta de defensa le confieren a la planta un poderoso mecanismo para priorizar una respuesta sobre la otra. En este sentido, las rutas del SA y JA se intersectan en varios puntos ya que ambas regulan las respuestas al estrés biótico antagónicamente. Por el contrario, el JA y etileno operan sinérgicamente regulando la defensa frente a hongos necrotróficos (Bari y Jones, 2009). Cada una de estas rutas conduce a la producción de un determinado grupo de compuestos, y su activación varía dependiendo del tipo de patógeno y del daño celular causado durante la infección (Boller y Felix, 2009, Castresana, 2013).



**Figura 4.** Representación esquemática simplificada de las rutas del ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno. Modificado de Pieterse *et al.* (2009).

Algunos microorganismos beneficiosos del suelo, tales como hongos micorrícicos y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, pueden inducir una forma fenotípicamente similar de inmunidad sistémica, llamada resistencia sistémica inducida (ISR por sus siglas en inglés). Similar a los PAMPs, diferentes patrones moleculares asociados a microorganismos beneficiosos son reconocidos por la planta, lo que resulta en una activación ligera pero eficaz de la respuesta inmune en los tejidos sistémicos (Hogenhout y Bos, 2011).

En contraste con la SAR que es dependiente de SA, la ISR provocada por microorganismos beneficiosos a menudo está regulada por vías de señalización dependientes de JA y etileno; y se asocia con la preparación para una mejor defensa, en lugar de la activación directa del mecanismo de defensa. Mientras que la SAR es predominantemente eficaz contra patógenos biotróficos que son sensibles a las defensas estimuladas por SA; la ISR ha demostrado ser eficaz contra patógenos e insectos que son sensibles a las defensas dependientes de JA y etileno (Wu y Baldwin, 2010).

### **Proteínas PR**

La resistencia de las plantas a las enfermedades a las que están expuestas continuamente, está asociada la mayoría de las veces con el desarrollo de una HR en el sitio de la infección. Simultáneamente con la HR, los niveles de SA se incrementan y se induce la expresión de varios genes asociados con la defensa, incluyendo los genes que codifican para las proteínas relacionadas con la patogenicidad. En adición a esto, las demás partes de la planta que no están infectadas desarrollan la SAR (Kachroo *et al.*, 2001).

El término de proteínas PR se define como aquellas proteínas codificadas por la planta hospedante y que son inducidas bajo condiciones patológicas. Estas condiciones patológicas se refieren al ataque de cualquier organismo patógeno (Sudisha *et al.*, 2011). Además, estas proteínas no se encuentran o están a concentraciones muy bajas en los tejidos saludables de las plantas. La acumulación de estas se relaciona con condiciones patológicas y otros factores que desarrollan estrés en la planta (Loon *et al.*, 2006). Estas proteínas son un punto de intersección en la amplia red de señalización producida por fitohormonas de la planta, como SA, JA y etileno, que tienen una participación importante en la defensa de estos organismos. La expresión constitutiva de algunas proteínas PR confiere a la planta mayor resistencia a un grupo específico de patógenos.

Los miembros de las diferentes familias de proteínas PR difieren en cuanto a su localización en la planta, expresión y actividad biológica. Además estas moléculas no se restringen solamente a una función de defensa, sino también fisiológicas (Sels *et al.*, 2008). Todas las proteínas PR reconocidas han sido clasificadas en 17 familias basándose en la similitud de secuencias, relaciones serológicas e inmunológicas y propiedades enzimáticas (Guest y Brown, 2000).

Las proteínas PR que inicialmente se descubrieron y caracterizaron eran típicamente ácidas, de baja masa molecular, resistentes a la degradación proteolítica y a los valores bajos de pH, y se describieron fundamentalmente en los espacios intercelulares de las hojas. Después de un proceso de infección en la planta, estas proteínas se acumulan en mayores concentraciones en las hojas (Hernández *et al.*, 2005). van Loon *et al.*, (2006) introdujeron el término general de “proteínas inducibles relacionadas con la defensa” para incluir las proteínas que no son detectadas en los tejidos saludables y que se ha demostrado que su síntesis se induce después de una infección patogénica. Las proteínas PR también son inducidas en respuesta a estrés en la planta provocado por factores ambientales extremos como la sequía, alta salinidad, metales pesados entre otros (Yu *et al.*, 2001).

Las PR1 son proteínas de bajo peso molecular (15-17 kDa). Esta familia es el grupo más abundante y se ha encontrado a altos niveles luego de un proceso de infección (Selitrennikoff, 2001). Las PR2 o glucanasas poseen actividad 1,3 –endoglucanasa *in vitro* y poseen una masa molecular entre 33 y 36 kDa (Ferreira *et al.*, 2007). Los miembros de este grupo son capaces de hidrolizar componentes de la pared celular de los hongos, como la celulosa, fundamentalmente en el ápice de la hifa donde este tipo de compuesto está más expuesto (Hernández *et al.*, 2005). Esta familia está subdividida en tres clases. Clase I son básicas y se pueden localizar en las vacuolas. Clase II y III son ácidas y se localizan en los espacios extracelulares (Theis y Stahl, 2004). Estas proteínas también participan en varios procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas. La clase I presenta actividad antifúngica comprobada mediante estudios *in vitro* e *in vivo*, donde se utilizaron plantas transgénicas con sobreexpresión de estas proteínas. Sin embargo la clase II ha demostrado tener actividad antifúngica *in vitro* pero solo si se aplica en combinación con quitinasas o con otros miembros de la clase I (Theis y Stahl, 2004).

Existe un grupo con actividad quitinasa que constituye el segundo más largo de proteínas antifúngicas. Estas son capaces de catalizar la hidrólisis de los enlaces glicosídicos presentes en los polímeros de N-acetil-D-glucosamina, principalmente en la quitina. Las quitinasas han sido agrupadas en dos categorías, exoquitinasas que actúan en los extremos no reductores de la cadena de quitina, y endoquitinasas que hidrolizan los enlaces más interiores del polímero (Gianinazzi y Gianinazzi-Pearson, 2007). Estas proteínas son incluidas dentro de tres familias de PR proteínas. De las clases Ia, Ib, II, IV, VI y VII pertenecen a la familia PR3; las clases III y V son incluidas en las familias PR8 y PR11 respectivamente. En adición a esto, algunas proteínas con baja actividad endoquitinasa se agrupan en la familia PR4 (del inglés: *chitin-binding proteins*). Como muchas otras proteínas PR, estas son sintetizadas de forma constitutiva e inducible. Las que son apoplásticas, debido a su actividad hidrolítica, pueden inhibir el crecimiento del hongo y generar fragmentos de quitina que pueden actuar como elicitores y activar otros mecanismos de defensa de las plantas. Durante las siguientes fases de la patogenicidad, luego de la penetración del hongo, las quitinasas vacuolares son inducidas para continuar degradando la quitina fundamentalmente de la hifa (Ferreira *et al.*, 2007).

Las PR3 tienen la mayoría un peso molecular entre 26 y 43 kDa y son endoquitinasas (Selitrennikoff, 2001). La expresión combinada de glucanasas y quitinasas en zanahoria transgénica, tomate y tabaco, fue mucho más efectiva en la prevención de enfermedades por patógenos que si estuvieran expresándose cada una por separado. Esto confirma la actividad sinérgica ente grupo de enzimas que ha sido reportado en estudios *in vitro* (Melchers y Stuiver, 2000). Por otra parte, en las PR4 están las proteínas fijadoras de quitina y tienen masas moleculares de 13-14 kDa (Hernández *et al.*, 2005).

Al grupo de las PR5 pertenecen las osmotinas y las proteínas similares a taumatina. Estas son básicas, con aproximadamente 24 kDa. Estas proteínas pueden inducir perforaciones en las células en los hongos. Este proceso puede ser llevado a cabo por una interacción específica de las proteínas con la membrana plasmática que resulta en la formación de poros transmembrana. Las osmotinas han mostrado un aumento de su actividad hidrolítica cuando se combinan con quitinasas y glucanasas (Sels *et al.*, 2008). Las PR6 son consideradas una subclase de las inhibidoras de proteasas (PIs; del inglés: *serine proteinase inhibitors*) (van Loon *et al.*, 2006).

Las PR7 poseen actividad endoproteinasa y se han visto involucradas en la disolución de las paredes celulares de patógenos (Jorda *et al.*, 2000). La actividad peroxidasa de la familia PR9 actúa catalizando la lignificación de la pared celular para de esta forma reforzarla y aumentar su resistencia (Passardi *et al.*, 2004). Los miembros de las PR10 muestran actividad ribonucleasa, lo que sugiere una posible resistencia a los virus (Park *et al.*, 2004).

En 1990, se aislaron las primeras defensinas provenientes del trigo y de la cebada, donde originalmente se caracterizaron como tioninas por su similar peso molecular y número de cisteínas (Sels *et al.*, 2008). Más tarde por sus reconocidas propiedades antimicrobianas y su estructura similar a proteínas de defensa en mamíferos e insectos, fueron denominadas defensinas de las plantas e incluidas en la familia PR12. Se han realizado estudios con diferentes especies y órganos de plantas donde se han logrado purificar proteínas de este grupo y que muestran *in vitro* un amplio rango de actividades biológicas. Estas incluyen actividad amilasa, bloqueo de canales iónicos y actividad antimicrobiana. Su actividad mejor caracterizada es la habilidad para inhibir el crecimiento de una amplia gama de hongos filamentosos y de levaduras *in vitro* (Guest y Brown, 2000).

Las PR13 o tioninas son pequeñas (5 kDa), usualmente básicas, ricas en cisteína y fueron originalmente aisladas de cereales. Las PR13 poseen una amplia actividad antifúngica y antibacteriana *in vitro*, y al igual que las defensinas, los efectos antimicrobianos son principalmente la permeabilización de las membranas celulares de los patógenos. La combinación de las tioninas con las proteínas de transferencia de lípidos trae como resultado una relación sinérgica y de cooperación entre ambos grupos (Stec, 2006).

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs por sus siglas en inglés) están agrupadas en el grupo PR14, y son de pequeño tamaño, ricas en cisteína y se han encontrado en una gran variedad de especies (Carvalho y Gomes, 2007, Yeats y Rose, 2008). Las LTPs se subdividieron en dos familias LTP1 y LTP2, las cuales presentan masas moleculares de 9 y 7 kDa, respectivamente. Aparte de esta diferencia en cuanto a la masa molecular, existen otras características entre las dos familias que son similares. Por ejemplo, el punto isoeléctrico alto y un patrón conservado de cuatro puentes disulfuro que le dan estabilidad y permiten la transferencia de lípidos entre las membranas. Estas proteínas generalmente contienen una cavidad interna hidrofóbica, y es posible que se pueden insertar en las membranas celulares de los hongos y formar un poro utilizando esta estructura (Carvalho y Gómez, 2007). Las LTPs

son capaces de transferir varios tipos de lípidos incluyendo fosfatidilinositol, fosfatidilcolina y galactolípidos. Además de que son inducibles tras la infección por patógenos, pueden responder a determinado estrés abiótico como la salinidad, sequía y bajas temperaturas (Ferreira *et al.*, 2007).

Las PR15 (oxalate oxidases) y PR16 (oxalate oxidase-like proteins) pueden generar peróxido de hidrógeno. Este es un compuesto tóxico para muchas especies de patógenos (Bernier y Berna, 2001, Hu *et al.*, 2003).

### **2.3.3. Genes expresados durante la interacción**

Las plantas actúan frente al estrés biótico y abiótico activando cascadas de señalización que eventualmente resultan en la síntesis de metabolitos secundarios de bajo peso molecular, en la generación de especies reactivas del oxígeno, lignificación de las paredes celulares, inducción de la HR y la activación de los genes que codifican para las proteínas. Estos genes han sido caracterizados en muchas especies de plantas y su expresión es inducida durante los procesos infecciosos (Buchanan *et al.*, 2015).

Las interacciones planta-patógeno son complejas e incluyen gran variedad de moléculas. Los genes que codifican para enzimas como la PAL (del inglés: *Phenylalanine ammonia-lyase*), la -1,3-glucanasa, quitinasas y peroxidases son altamente expresados en estos procesos en varios patosistemas. PAL controla la entrada de los compuestos L-fenil-alanina en las rutas de los fenilpropanoides, las cuales resultan en la síntesis de numerosos compuestos como son las fitoalexinas con actividad antimicrobiana conocida. Las quitinasas y las -1,3-glucanasas son importantes en la defensa de las plantas ya que sus sustratos, la quitina y -1,3-glucan, son componentes de la pared celular de los hongos (Boller y He, 2009). Las peroxidases (POX) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son importantes durante la síntesis de la lignina, el cual es un compuesto importante para la defensa de las plantas al contribuir con el engrosamiento de la pared celular (Torres *et al.*, 2012).

La resistencia natural a las enfermedades es común en varias especies de bananos como en el cultivar 'Calcutta 4' (*Musa AA*) y en otros híbridos. La presencia de compuestos fenólicos ha sido comprobado en plantas resistentes a dicha enfermedad (Torres *et al.*, 2012, Hidalgo *et al.*, 2016). Además, enzimas como la PAL y la peroxidasa, proteínas PR así como especies

reactivas del oxígeno (ROS) están involucradas en las respuestas de defensa de *Musa* spp. frente al ataque de *P. fijiensis* (Cavalcante *et al.*, 2011, Passos *et al.*, 2012).

Estudios realizados con dicho cultivar resistente a *P. fijiensis* han demostrado que existe una rápida inducción de la enzima PAL, la  $\alpha$ -1,3-glucanasa y peroxidasas en las primeras 72 h posteriores a la infección. Por el contrario, se informa una inducción tardía de estas enzimas en el cultivar susceptible ‘Williams’ (AAA). Las fluctuaciones de los niveles de PAL y los genes que codifican para esta enzima muestran un aumento en su expresión en respuesta al estrés biótico y abiótico (Portal *et al.*, 2011).

*P. fijiensis* se mantiene en su fase biotrófica de 3-4 semanas hasta que comienza la fase necrotrófica, proceso en el cual participan gran cantidad de enzimas y toxinas propias del patógeno. En la interacción incompatible, la planta hospedante responde con necrosis temprana en el sitio de penetración del hongo, similar a la HR (Churchill, 2011, Isaza *et al.*, 2016). Según (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2018), estudios realizados de esta interacción, sugieren que existe una regulación del metabolismo primario, del ciclo del metilo, de compuestos antioxidantes y de las rutas de los fenilpropanoides en las especies de *Musa* en etapas tempranas de la infección con el hongo. Los cloroplastos, al igual que el núcleo y otros organelos, son importantes en la activación de los mecanismos de defensa de las plantas contra los patógenos que las afectan (Bolton, 2009, Caplan *et al.*, 2015). En este sentido, los cloroplastos participan en la síntesis de mediadores de las respuestas inmunes como son algunas fitohormonas y ROS (Foyer y Noctor, 2009, Serrano *et al.*, 2016).

La generación de ROS en los cloroplastos depende de varios aspectos como la fijación del CO<sub>2</sub>, que puede a su vez interferir con la producción de O<sub>2</sub> por el Fotosistema I (PSI). Los genes que intervienen en estos procesos están regulados positivamente a los 6 dpi en plantas ‘Calcutta 4’ infectadas con *P. fijiensis*. Según estos resultados, existe la hipótesis de que el PSI contribuye a la producción de O<sub>2</sub> en los cloroplastos en etapas tempranas de la infección en las interacciones incompatibles (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2018). Generalmente, la producción de O<sub>2</sub> está acompañada de la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que forma parte de la cascada oxidativa que pudiera estar asociada al reconocimiento del patógeno (Camejo *et al.*, 2016). En este patosistema, ha sido previamente informado que en el cultivar ‘Calcutta 4’, las primeras respuestas de defensa contra *P. fijiensis* parecen estar vinculadas con la acumulación de O<sub>2</sub> y con la actividad de la peroxidasa (POX) (Cavalcante *et al.*, 2011, Torres *et al.*, 2012).

Las ROS pueden funcionar como moléculas de señalización que inducen la expresión de otros mecanismos de defensa como son las proteínas PR, la HR y el engrosamiento de la pared celular (Cavalcante *et al.*, 2011, Torres *et al.*, 2012, Kangasjärvi *et al.*, 2014, Rodríguez *et al.*, 2016). SAM (del inglés: *S-adenosyl-L-methionine*) es producida a partir de la metionina en el ciclo del metilo. Es de esperar que el gen que codifica para esta enzima tenga una expresión estable debido a que SAM es esencial como donador del grupo metilo para varios metabolitos (Moffatt y Weretilnyk, 2001). Sin embargo, los perfiles de expresión de *Sams* muestran resultados diferentes entre las plantas infectadas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’.

Los fenilpropanoides constituyen unidades básicas para la síntesis de varios compuestos fenólicos que participan en la defensa contra *P. fijiensis* (Portal *et al.*, 2011, Rodríguez *et al.*, 2016). La actividad de estos compuestos en *Musa* spp. se observa durante procesos como el engrosamiento de la pared celular, lignificación y la síntesis de fitoalexinas (Hidalgo *et al.*, 2009, Cavalcante *et al.*, 2011, Echeverri *et al.*, 2012, Hidalgo *et al.*, 2016). En plantas de ‘Calcutta 4’ infectadas con *P. fijiensis* se ha observado un incremento en la expresión de genes altamente relacionados con la defensa como *C4h* (del inglés: *Cinnamate 4-hydroxylase*), *Chs* (del inglés: *Chalcone synthase*) e *Irl* (del inglés: *Isoflavone reductase-like*) (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2018). Esto apoya la importancia de estas rutas en *Musa* spp. para la defensa contra *P. fijiensis*. Por otra parte, en plantas de ‘Grande naine’ infectadas, se ha comprobado una baja regulación de estos patrones de expresión a los 12 dpi, lo cual coincide con la aparición de los primeros síntomas de la Sigatoka negra. Portal *et al.* (2011) comprobaron la inducción de respuesta de defensa, incluyendo la expresión de genes relacionados con los fenilpropanoides, en etapas tardías de la enfermedad en plantas de ‘Grande naine’. El reconocimiento oportuno del patógeno y la adecuada expresión de las respuestas de defensa parece ser la mayor diferencia entre las plantas resistentes y las susceptibles (McDowell y Dangl, 2000).

Además, según Portal *et al.* (2011), en las etapas avanzadas de la infección, las rutas del JA y del ET se activan, lo cual corresponde con la fase necrotrófica del ciclo de vida del patógeno. Análisis mediante PCR cuantitativo han revelado que los genes que codifican para compuestos como las proteínas PR y GDSL-like lipasa son expresados solamente a los 30 días dpi, lo cual indica que el hongo pudiera estar suprimiendo las respuestas de defensa de la planta. En este estudio también se encontró un gen del hongo que codifica para la UDP-glucosa

pirofosforilasa inducido a los 37 dpi. Dicha enzima participa en la biosíntesis de trealosa, compuesto que probablemente fue inducido en respuesta a la activación de los genes antifúngicos de la planta y que tiene como función la protección de la membrana celular del hongo.

Por otra parte, los factores de transcripción WRKY están específicamente relacionados con los eventos transcripcionales que ocurren en presencia de estrés biótico o abiótico. En estas plantas se ha caracterizado y documentado el factor de transcripción *Musa* WRKY71, el cual fue inducido en respuesta a una gran variedad de estímulos que ocasionaron estrés a las plantas estudiadas según (Shekhawat y Ganapathi, 2013).

Los resultados encontrados en los análisis bioquímicos y de expresión genética realizados en plantas infectadas con *P. fijiensis* en los cultivares ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ demuestran la importancia de las respuestas de defensa tempranas de estas plantas. La información obtenida en la bibliografía contribuye a aumentar el conocimiento molecular acerca de este patosistema, lo cual es fundamental para el desarrollo de estrategias de control y manejo de la Sigatoka negra.

### **3. Materiales y métodos**

La presente investigación se llevó a cabo en el periodo de enero de 2017 a marzo de 2018 en los laboratorios de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y en el Instituto de Biotecnología de las Plantas, ambas instituciones pertenecientes a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba.

#### **3.1. Efecto del ácido jasmónico, etefón y benzotiadiazol exógeno en el desarrollo de la Sigatoka negra en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ (*Musa AAA*)**

Para determinar el efecto de las fitohormonas en la respuesta de defensa de las plantas de ‘Grande naine’ frente *P. fijiensis* se realizó un primer experimento donde, previo a la inoculación, se llevó a cabo una aplicación exógena con las fitohormonas JA, etefón (ET; precursor sintético del etileno), benzotiadiazol (BTH; análogo del SA) y se estableció un tratamiento control con agua destilada. En este experimento se utilizaron 10 plantas por tratamiento que se ubicaron aleatoriamente en el cuarto de inoculación. En todos los experimentos se utilizó el cultivar susceptible ‘Grande naine’, ya que en este cultivar los síntomas de la Sigatoka negra se desarrollan con más severidad que en cultivares resistentes. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se realizó un segundo experimento donde las plantas de ‘Grande naine’, previo a la inoculación, se trataron solamente con JA, ET y sus inhibidores el ácido salicilhidroxiaminico (SHAM) y el ácido aminooxiacético (AOA), respectivamente. En este experimento se utilizaron 18 plantas por tratamiento y también se ubicaron aleatoriamente.

#### **Cultivo de *P. fijiensis***

Se utilizó el aislado CCIBP-Pf-83 de *P. fijiensis* de la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas en Santa Clara, Cuba. Para la producción de micelio, el hongo se creció en un medio de cultivo caldo papa dextrosa (PDB; Difco, Alemania) por 15 días en una zaranda rotatoria (120 rpm) a 28 °C. El inóculo se preparó mezclando el micelio en un homogeneizador Ultra Turrax T25 (Rose Scientific Ltd., Canadá) por 1 min. La concentración de los fragmentos de micelio de la suspensión de *P. fijiensis* se determinó mediante observación al microscopio óptico (Leitz Wetzlar, Alemania) en cámara de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania). Para comprobar la identidad del hongo se utilizó la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región ITS (del inglés: *internal transcribed spacer*) del ADN ribosomal utilizando los cebadores R635 y MF137 (Johanson y Jeger, 1993).

### **Propagación de las plantas**

Las plantas de *Musa acuminata* subgrupo Cavendish cv. ‘Grande naine’ se obtuvieron de la colección de germoplasma del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Cuba. Estas se propagaron *in vitro* durante ocho subcultivos, posteriormente se enraizaron y se aclimatizaron en casa de cultivo (Orellana, 1994). El sustrato empleado fue una mezcla de compost 80% y zeolita 20% (v/v). Las plantas se crecieron por un periodo de 90 días bajo condiciones de casa de cultivo, con fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad y una temperatura entre 28-32 °C.

### **Aplicación exógena de fitohormonas e inhibidores**

Se utilizó un aspersor para la realización del tratamiento de las plantas de ‘Grande naine’ con fitohormonas e inhibidores (Tabla I). La misma se realizó en todas las hojas de las plantas seleccionadas, tanto en el has como en el envés. .

Tabla I. Fitohormonas e inhibidores utilizados en el estudio

Fitohormonas e inhibidores	Concentración a la que se utilizaron ( $\mu\text{M}$ )
Ácido jasmónico (JA)	100
Etefon (ET)	500
Benzotiazol (BTH)	100
Ácido salicilhidroxiaminico (SHAM)	200
Ácido aminooxiacético (AOA)	25

### **Inoculación de *P. fijiensis* en plantas de ‘Grande naine’**

Previo a los experimentos de inoculación las plantas se adaptaron por espacio de una semana a las condiciones del cuarto de inoculación. La inoculación de las plantas de bananos con *P. fijiensis* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Leiva-Mora *et al.* (2010). Esta se realizó 24 h después de la aspersión con las fitohormonas o inhibidores y se dejaron secar las hojas para posteriormente aumentar la humedad relativa y mantener un régimen diario de riego. Para

la inoculación se utilizó una suspensión micelial ( $1 \times 10^5$  fragmentos de micelio  $\text{mL}^{-1}$ ) del aislado CCIBP-Pf-83 de *P. fijiensis*. La evaluación del desarrollo de los síntomas se realizó cada siete días y hasta los 70 dpi, según la escala evaluativa descrita por Alvarado- Capó *et al.* (2003) (Tabla II). En este sentido, cada planta se consideró una unidad experimental y solo se analizaron las hojas inoculadas 2 y 3. Además, se utilizó la fórmula propuesta por Mckinney y Davis (1925) para calcular el índice de infección:

$$\text{Índice de infección (\%)} = \left[ \frac{(\text{grado} \times \text{cantidad de plantas en ese grado})}{(6 \times \text{total de plantas})} \right] \times 100$$

**Tabla II.** Escala descriptiva para la evaluación del desarrollo de los síntomas en hojas de *Musa* spp. inoculadas con *Pseudocercospora fijiensis* (Alvarado- Capó *et al.*, 2003)

Grados de la escala	Síntomas
0	Hoja sin síntomas
1	Hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por el envés y sin síntomas por el haz
2	Hojas con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el envés de la hoja y sin síntomas por el haz
3	Hojas con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por el haz
4	Hoja con manchas negras (elípticas o circulares) con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene áreas de tejido verde
5	Hoja con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el paquete estadístico PASW Statistics, versión 21 para Windows, verificándose los supuestos de normalidad Shapiro Wilk. Los datos que no seguían distribución normal se procesaron mediante análisis de varianza para dos variables no relacionadas, U de Mann Whitney, y varias muestras independientes, Kruskal Wallis. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de  $p < 0,05$ .

### **3.2. Expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ (*Musa* AAA) tratado con la hormona de mejor respuesta frente a la Sigatoka negra**

Para analizar la expresión de los genes que codifican para las proteínas PR en el cultivar susceptible 'Grande naine', asperjado con la hormona de mejor respuesta para el control del desarrollo de la Sigatoka negra, se realizó un tercer experimento de inoculación. Se utilizaron 18 plantas del cv. 'Grande naine' ubicadas de forma aleatoria y se mantuvieron iguales condiciones experimentales que las descritas en el acápite 3.1. Pasadas 24 h de asperjar la fitohormona se realizó la primera toma de muestra (control), hojas 2 y 3, a las 10 am. El otro grupo de muestras se tomaron posterior a la inoculación con *P. fijiensis*, a las 12, 24, 48 y 72 h, siempre a las 10 am, las cuales se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -40 °C hasta su utilización y posterior análisis por RT-PCR.

### **Extracción de ARN y síntesis de ADNc**

Para la purificación del ARN se utilizó el *Spectrum<sup>TM</sup> Plant Total RNA Kit* (Sigma, EE.UU.) y se siguieron las instrucciones del fabricante. El procedimiento se llevó a cabo a partir de 100 mg de tejido de las muestras de hojas congeladas del cultivar 'Grande naine' infectadas con *P. fijiensis*. Primeramente, se añadieron 500 µL de **Solución de lisis-2-mercaptoetanol** por cada 100 mg de tejido pulverizado previamente con nitrógeno líquido. Luego, se aplicó *vortex* durante 30 s aproximadamente y se incubó a 56 °C por 5 min. Seguidamente, se centrifugó a máxima velocidad por 3 min y el sobrenadante se vertió en una **Columna de filtración**. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad por 1 min y se extrajo el extracto clarificado. A continuación se añadieron 500 µL de **Solución de unión** al clarificado y se mezcló brevemente. De esta mezcla, se extrajeron 700 µL hacia una **Columna de unión**. Luego, se centrifugó por 1 min y se extrajo el líquido residual. Posteriormente, se realizaron tres pasos de lavado, uno con **Solución de lavado 1** y dos con **Solución de lavado 2**, y se secó la columna centrifugando a máxima velocidad por 1 min. Por último, se realizó la elución con 50 µL de **Solución de elución**. Se dejó reposar el tubo por 1 min y después se centrifugó a máxima velocidad igualmente por 1 min. La concentración y la pureza del ARN se determinó en Espectrofotómetro *BioPhotometer*® (Eppendorf, Alemania).

Para la síntesis de ADNc a partir del ARN purificado se utilizó el *QuantiTect Reverse Transcription Kit*, según las recomendaciones del fabricante (Qiagen, Alemania). Para realizar este procedimiento, se partió de 1 µg del ARN total. Primeramente, se preparó la reacción para eliminar el ADN genómico (ADNg) remanente en las muestras de ARN en un volumen final

de 14  $\mu$ L, la cual se incubó durante 2 min a 42 °C. Seguidamente, se preparó la reacción de reverso transcripción en un volumen final de 20  $\mu$ L, la cual se incubó durante 15 min a 42 °C y a 95 °C por 3 min para inactivar a la enzima.

### Análisis mediante PCR

El análisis de la expresión de genes se llevó a cabo por PCR a 0 (control), 12, 24, 48 y 72 hpi. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L y para ello se empleó 1  $\mu$ L de ADNc, tampón comercial 1x, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4  $\mu$ M de cada cebador y 1,25 U de Top Taq™ ADN polimerasa (Qiagen, Alemania). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf, Alemania). Las condiciones de reacción incluyeron un ciclo inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 29 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 50-70 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 7 min a 72 °C. El resultado de la reacción se examinó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% en tampón TBE 1X y tinción con bromuro de etidio. Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3 (Tabla II) (Rozen y Skaletsky, 2000).

Los genes que codifican para PR1 (Berg *et al.*, 2007), PR10 (Rodriguez *et al.*, 2016), Lipoxigenasa-1 (Lox1) (Zhao *et al.*, 2013), Jar1, Osmotina, PR4, Actina (Portal *et al.*, 2011) y tipo Germin (Portal, 2009) se usaron para los estudios de expresión en hojas del cultivar ‘Grande naine’ asperjadas con fitohormonas e infectado con *P. fijiensis*. Las secuencias de los cebadores usados se muestran en la Tabla III.

**Tabla III.** Cebadores utilizados en este estudio.

No.	Gen	Cebador directo 5' 3'	Cebador reverso 5' 3'	Amplificación (pb)
1	<i>Lox1</i>	CCCAACAGCGTGTCCATCTA	CTTTGCGTCCAAGCCACCAC	202
2	<i>Jar1</i>	AAGAAAAGCTGGAGGTGGTG	GAAGCTCAACAGGTCCGATG	201
3	<i>Osmotina</i>	CGAGGTAAGTGTGCAACTCC	GTCTGACCGTCCTTGGGATA	103
4	<i>PR1</i>	CGACTACGACAGCAACTCGT	TCCGGCCTTATTTACATTC	238
5	<i>tipo Germin</i>	CCCGATGTTGAACTGGAAGT	GTCTCAACCCTCCTCACTCG	187
6	<i>PR4</i>	CCGAGGTAAGTCTTCTCCTCCA	CCGGGCAGGTACCACTACTA	119
7	<i>PR10</i>	GCACGTCCGTCATCTTCTG	GTACAAGGCGATCGAAGGAG	173
8	<i>Actina</i>	GGTTAGACATCCTTTTCTCTC	GCATCATCTCCAGCGAAAC	113

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.1. Efecto del ácido jasmónico, etefón y benzotiadiazol exógeno en el desarrollo de la Sigatoka negra en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ (*Musa* AAA)

La identidad del aislado CCIBP-Pf-83 de *P. fijiensis* se comprobó mediante la amplificación por PCR. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1 kb (dato no mostrado), el cual se corresponde con el tamaño esperado de la región ITS del ADN ribosomal (Johanson y Jeger, 1993). En el 2003, este aislado se utilizó para inocular las plantas de *Musa* spp. como parte del desarrollo de una escala descriptiva en la evaluación de los síntomas de la Sigatoka negra (Alvarado-Capó *et al.*, 2003). También se utilizó para elaborar un protocolo de inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *P. fijiensis* (Leiva-Mora *et al.*, 2010) y fue caracterizado en base a su patogenicidad y agresividad, así como a sus caracteres culturales y morfológicos por Martín *et al.* (2004).

Las plantas de ‘Grande naine’, previamente asperjadas con JA, ET, BTH, inoculadas con *P. fijiensis* mostraron los síntomas típicos de los diferentes estadios de la enfermedad, de acuerdo a (Alvarado-Capó *et al.*, 2003) (Figura 5).

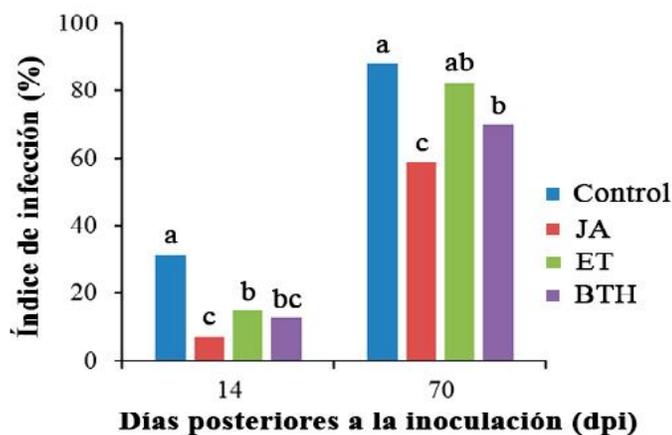


**Figura 5.** Síntomas de plantas de ‘Grande naine’ inoculadas con una suspensión micelial de *Pseudocercospora fijiensis* (CCIBP-Pf-83), previamente asperjadas con JA (100  $\mu$ M), ET (500  $\mu$ M), BTH (100  $\mu$ M) y agua destilada (control). La foto fue tomada a los 70 dpi.

Los primeros síntomas se comenzaron a visualizar a los 14 dpi. Las primeras lesiones eran pequeñas, puntiformes y de coloración pardo-rojiza, otras con los contornos irregulares y solo por el envés de la hojas. Luego estas lesiones aparecieron también en el haz de las hojas. En los tratamientos donde se observó un mayor progreso de la enfermedad, las manchas se fueron tornando negras y adoptaron formas elípticas o circulares con bordes cloróticos. Finalmente,

las hojas se encontraban casi completamente necrosadas con los centros de las manchas secos y grisáceos.

La Figura 6 muestra los resultados del cálculo del índice de infección en las plantas de ‘Grande naine’ inoculadas con *P. fijiensis*, las cuales se trataron previamente con las diferentes fitohormonas. En todos los tratamientos, los síntomas de la enfermedad comenzaron a desarrollarse a los 14 dpi, donde se observaron diferencias significativas en el índice de la infección entre los diferentes tratamientos y el control. A los 70 dpi, también se encontraron diferencias significativas en el índice de infección entre los tratamientos y entre ellos y el control. Las plantas tratadas con JA mostraron el menor valor del índice de infección comparado con el resto de los tratamientos, lo cual sugiere que la aplicación exógena de esta fitohormona confiere a la planta una mejor respuesta de defensa frente a *P. fijiensis*. Por otra parte, se observaron diferencias significativas en el índice de la enfermedad entre los tratamientos con ET y JA; sin embargo, el tratamiento con ET no mostró diferencias significativas en comparación con el control y el tratamiento con BTH. Además, las plantas tratadas con BTH mostraron diferencias significativas con respecto al control y al tratamiento con JA.

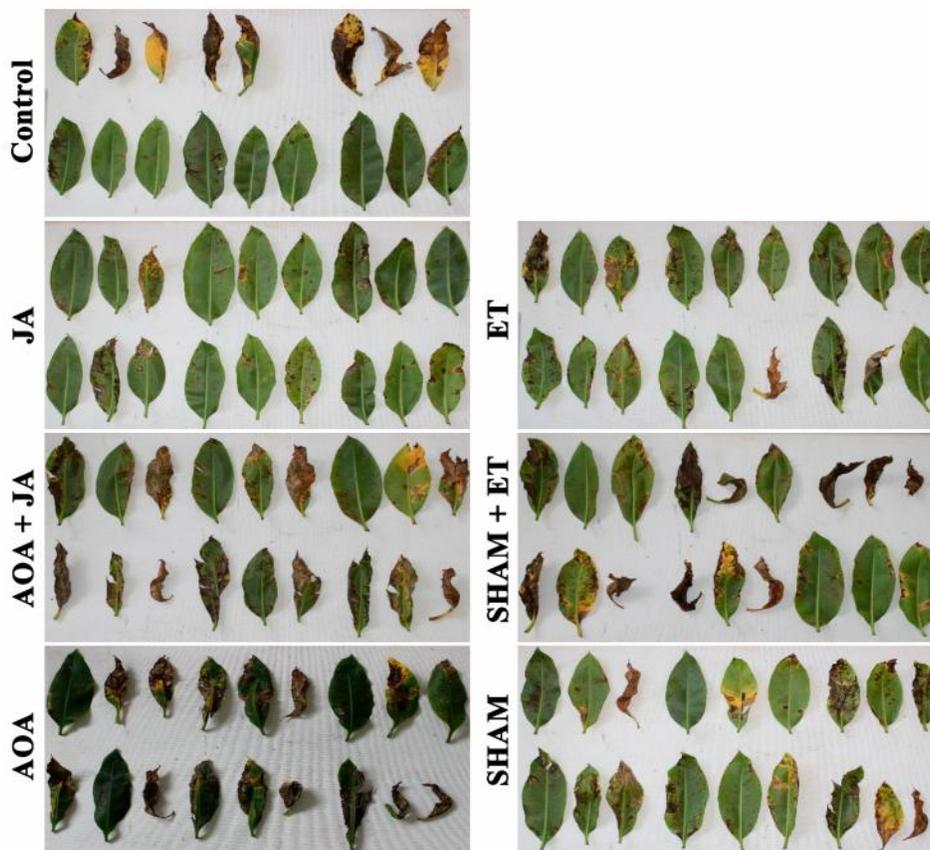


**Figura 6.** Índice de infección en plantas de ‘Grande naine’ inoculadas con una suspensión micelial de *Pseudocercospora fijiensis* (CCIBP-Pf-83), previamente asperjadas con JA (100  $\mu$ M), ET (500  $\mu$ M), BTH (100  $\mu$ M) y la solución control (agua destilada). Para el cálculo del índice de infección se utilizó la escala propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003). Las barras con letras diferentes en los días posteriores a la inoculación representan diferencias significativas para  $p < 0,05$ , según análisis de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney.

El papel del JA en el control de la Sigatoka negra en plantas de ‘Grande naine’ se comprobó mediante el empleo de un inhibidor (SHAM) de su ruta de biosíntesis. Además, se utilizó el

ET debido a que generalmente presenta una acción sinérgica con la ruta del JA frente a los patógenos con estilo de vida necrotrofico o hemibiotrofico como *P. fijiensis*.

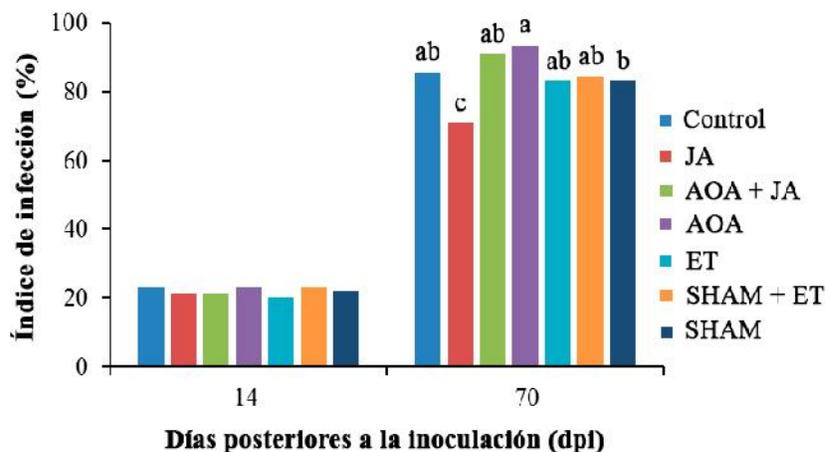
Al igual que en el experimento anterior, las plantas de ‘Grande naine’, previamente asperjadas con JA, ET, SHAM, AOA, SHAM+ET, AOA+JA, inoculadas con *P. fijiensis* mostraron los síntomas típicos de los diferentes estadios de la enfermedad (Figura 7).



**Figura 7.** Síntomas de plantas de ‘Grande naine’ inoculadas con una suspensión micelial de *Pseudocercospora fijiensis* (CCIBP-Pf-83), previamente asperjadas con JA (100  $\mu$ M), ET (500  $\mu$ M), BTH (100  $\mu$ M) AOA (25  $\mu$ M), SHAM (200  $\mu$ M) y la solución control (agua destilada). La foto fue tomada a los 70 dpi.

Hasta los 14 dpi, no se encontraron diferencias estadísticas significativas en el índice de infección para todos los tratamientos. A los 70 dpi, el tratamiento con JA mostró el menor valor del índice de infección (71,11%). Los demás tratamientos mostraron valores superiores del índice de infección sin diferencias estadísticas entre ellos y el control. Sin embargo, los tratamientos donde se empleó el AOA, inhibidor de la ruta de síntesis del etileno, mostraron los valores más altos en el índice de infección y además diferencias significativas con el tratamiento con JA+ *P. fijiensis*. Estos resultados sugieren que el tratamiento con JA confiere a

la planta una mejor respuesta de defensa, pero se requiere que la ruta de síntesis del ET este activada (Figura 8).



**Figura 8.** Índice de infección en plantas de ‘Grande naine’ inoculadas con una suspensión micelial de *Pseudocercospora fijiensis* (CCIBP-Pf-83), previamente asperjadas con JA (100  $\mu$ M), AOA (25  $\mu$ M), AOA + JA, ET (500  $\mu$ M), SHAM (200  $\mu$ M) y SHAM + ET y la solución control (agua destilada). Los inhibidores se asperjaron 24 h previas a la inoculación con *P. fijiensis*. Para el cálculo del índice de infección se utilizó la escala propuesta por (Alvarado-Capó *et al.* (2003). Las barras con letras diferentes en los días posteriores a la inoculación representan diferencias significativas para  $p < 0,05$ , según análisis de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney.

Las principales fitohormonas que producen las plantas son las auxinas, giberelinas (GA), citokininas (CK), ácido abscísico (ABA), etileno, SA, JA, brasinosteroides (BR) y estrigolactonas. Dentro de este grupo, el ABA, SA, JA y etileno son fundamentales para mediar la respuesta de defensa de las plantas frente a estrés biótico y abiótico. Generalmente, el ABA está relacionado con la defensa frente al estrés abiótico. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables, se incrementan los niveles de esta fitohormona en los tejidos vegetales (Lata y Prasad, 2011, Nakashima y Yamaguchi-Shinozaki, 2013). Contrario a esto, el SA, el JA y el etileno tienen mayor importancia en los mecanismos de defensa de las plantas frente al estrés biótico y sus niveles se incrementan cuando ocurre un proceso de infección en la planta (Bari y Jones, 2009). Las diferencias en el índice de la infección encontrados, en este trabajo, en los diferentes días posteriores a la inoculación de *P. fijiensis* confirman la participación de estas fitohormonas en la defensa de plantas del cultivar ‘Grande naine’.

Es ampliamente reconocido que el aumento en los niveles de JA, como resultado de un proceso de infección, está relacionado con la respuesta de defensa en las plantas. En este sentido, el proceso de infección es fundamentalmente causado por patógenos de estilo de vida

necrotrofico (Glazebrook, 2005, Verma *et al.*, 2016). La expresión de los genes relacionados con la ruta de esta fitohormona está mediada fundamentalmente por el factor de transcripción *Jasmonate Insensitive 1/MYC2* (JIN1/MYC2) (Eulgem y Somssich, 2007). Además, se ha informado que varios miembros de la familia *Apetal A2/Ethylene-Responsive Factor* (AP2/ERF), como el ERF1, ERF2, ERF5 y ERF6, participan también en la regulación positiva de esta ruta como respuesta al estrés (Mizoi *et al.*, 2012). Las diferencias entre las plantas tratadas con JA y el resto de los tratamientos, que se observan en la Figura 8, ponen en evidencia la participación del JA como mediador de la respuesta de defensa en las plantas de *Musa* sp. frente a la infección por *P. fijiensis*.

La ruta de biosíntesis del SA es activada mayormente por la detección de organismos patógenos, y puede inducir mecanismos de defensa en el sitio de la infección y en otras partes distales de la planta, este último denominado SAR. Mutantes insensibles al SA o deficientes en la acumulación de este muestran un aumento en la susceptibilidad a la infección por patógenos (Loon *et al.*, 2006). Para que ocurra la SAR, la infección inicial del patógeno debe resultar en la formación de puntos necróticos, como parte de la HR o como síntomas de la enfermedad. SAR es inducida más fuertemente en la ETI que en la PTI, y durante ella son activados varios de los genes que codifican para las proteínas PR y que pueden actuar como mecanismo de defensa en toda la planta (Buchanan *et al.*, 2015). Uno de los compuestos químicos sintéticos más utilizados y potentes que pueden inducir la SAR es el BTH por su capacidad de imitar al SA y de inducir la SAR. Generalmente, la ruta del SA está relacionada con la modulación de mecanismos de defensa frente a organismos patógenos de estilo de vida biotróficos o que en su ciclo de vida tienen una etapa inicial biotrófica (Glazebrook, 2005). Por tal motivo, las diferencias encontradas en el índice de la enfermedad en los tratamientos de JA y BTH con el control demuestran la participación de ambas rutas en la respuesta de las plantas de *Musa* sp. frente al hongo hemibiotrófico *P. fijiensis*.

Por otra parte, la fitohormona volátil etileno, es también un constituyente importante en la modulación de las respuestas de defensa (Broekaert *et al.*, 2006, Dahl y Baldwin, 2007, Sato *et al.*, 2010). El etileno puede actuar como regulador positivo y negativo en la inmunidad de las plantas. En este sentido, en *Arabidopsis* potencia la expresión de la PR1 como parte de las respuestas del SA (Vos *et al.*, 2006), y en tabaco es esencial para el comienzo de SAR (Verberne *et al.*, 2003). Además, los factores de transcripción EIN3 y EIL1 participan en la

represión de los genes implicados en la detección de los PAMPs en *Arabidopsis*, lo cual influye en la acumulación de SA en los tejidos infectados (Chen *et al.*, 2009).

El etileno también tiene efectos en el desenlace de la respuesta mediadas por el JA. Cuando ambas fitohormonas son producidas en combinación, como cuando ocurre una infección por un patógeno de estilo de vida necrotrófico o hemibiotrófico, el etileno actúa de forma sinérgica favoreciendo la regulación positiva de la ruta del JA mediada por ERF, y regulando negativamente la mediada por MYC. Esto trae como resultado que se prioricen la defensa dependiente del JA y etileno asociadas a este tipo de patógeno (Lorenzo *et al.*, 2003, Anderson *et al.*, 2004, O.Lorenzo *et al.*, 2004, Pre *et al.*, 2008). Los factores de transcripción ERFs son los principales reguladores de la ruta de biosíntesis del etileno durante el proceso de defensa (Gamalero y Glick, 2012). De forma general, el etileno puede interferir de forma antagónica con la ruta del SA o promoviendo la del JA para mejorar los mecanismos de defensa de la planta. La interacción entre las rutas de estas fitohormonas provee a las plantas de una poderosa capacidad de regular su sistema inmune innato en respuesta a los diferentes tipos de estrés a la que está sometida constantemente. De esta forma, la planta puede utilizar sus fuentes de energía de forma eficiente (Pieterse *et al.*, 2009, Jaillais y Chory, 2010, Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

El ácido salicilhidroxiaminico (SHAM) y el ácido aminooxiacético (AOA) son considerados potentes inhibidores de las rutas de biosíntesis del JA y del etileno respectivamente. Ambos actúan en los pasos limitantes de estas rutas por lo que se utilizan frecuentemente en experimentos en plantas para evitar la producción de estas fitohormonas. En este sentido, se conoce que el SHAM inhibe la lipooxigenasa (*LOX*) que es la enzima clave en la ruta de biosíntesis del JA. Por otra parte, el AOA regula negativamente a la enzima ACC sintasa por lo que evita que se sintetice al ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) que constituye el precursor inmediato del etileno (Yuan *et al.*, 2016).

Según Nahar *et al.* (2011), la aplicación exógena de SHAM, incrementó significativamente la susceptibilidad de plantas de arroz frente a la infección por *Meloidogyne graminicola*. De igual forma, se pudo comprobar que la inhibición de la ruta del etileno mediante la aplicación del AOA (Iwai *et al.*, 2006), aumenta la susceptibilidad de las plantas. También, Zhou *et al.* (2015), comprobaron la efectividad de SHAM como parte de un estudio para ver a relación entre el óxido nítrico (NO) y la fitohormona JA en la defensa de plantas de tomate frente al

ataque del nematodo *Meloidogyne incognita* (RKNs). Se pudo observar que las plantas tratadas con SHAM incrementaron significativamente la susceptibilidad a la infección por RKNs.

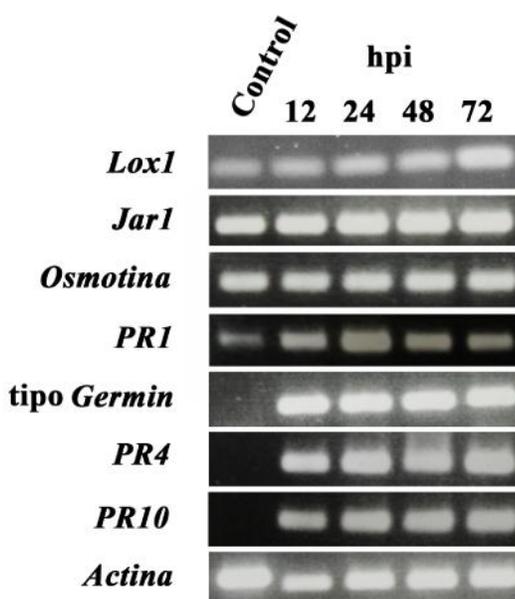
Por otra parte, el tratamiento de plantas de *Atractylodes lancea* con el AOA suprime la acumulación de ET inducida por el hongo endofítico *Gilmaniella* sp. AL12 según un estudio realizado por Yuan *et al.* (2016). Además, en este trabajo se evidenció la participación del etileno como regulador de las rutas del JA y SA, ya que el tratamiento con AOA afectó negativamente la producción de estas fitohormonas inducidas por el hongo. Teniendo en cuenta estos resultados, en el segundo experimento donde se utilizaron tratamientos que incluían a los inhibidores SHAM y AOA para observar, en los diferentes casos, como se afectaba el índice de infección *Pseudocercospora fijiensis*, cuando las rutas de las fitohormonas JA o etileno se encontraran inhibidas en el cultivar ‘Grande naine’. Las diferencias encontradas en el índice de infección entre los tratamientos, evidenció la potente acción de estos inhibidores en las rutas de biosíntesis de las fitohormonas JA y etileno como mecanismo de respuesta de las plantas de *Musa* spp. frente a *P. fijiensis*. Se comprobó que existe una acción sinérgica necesaria entre etileno y JA para disminuir los índices de infección por Sigatoka negra, pero se necesitan otros estudios a nivel molecular que permitan corroborar este planteamiento.

#### **4.2. Expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad en el cultivar susceptible ‘Grande naine’ (*Musa* AAA) tratado con la hormona de mejor respuesta frente a la Sigatoka negra**

La expresión de proteínas relacionadas con la patogenicidad en el cultivar ‘Grande naine’ tratado con JA, durante la interacción con *P. fijiensis* se muestra en la figura 9. Los genes que codifican para *Lox1*, *Jar1*, *Osmotina* y *PR1* fueron expresados en el tratamiento JA+*P. fijiensis* y el control. Pero Los genes *Lox1* y *Jar1* reforzaron su expresión progresivamente hasta a las 72 hpi y para el gen de la *PR1* se observó la máxima expresión a las 24h. Para el caso del gen *Osmotina* no se observaron diferencias de expresión con respecto al control (plantas asperjadas con JA). Los genes que codifican para el tipo *Germin*, *PR4* y *PR10* no fueron expresados en plantas pertenecientes al grupo control, pero si en las plantas infectadas con *P. fijiensis*. Los gens *PR4* y *PR10* también reforzaron su expresión en el tiempo, en el caso

del tipo *Germin*, la intensidad en las bandas en todos los tiempos es igual. Como gen de referencia en este estudio de expresión se empleó el gen *Actina* ya que presenta un perfil de expresión constitutivo y este no cambia durante procesos de infección en las plantas. Teniendo en cuenta que para los tiempos analizados en este estudio no fue posible, en algunos casos, discernir las diferencias entre los niveles de transcritos mediante RT-PCR, sería de gran utilidad continuar estos estudios mediante el empleo de una técnica de cuantificación más sensible como el PCR en tiempo real.

Los genes relacionados con la defensa de las plantas están regulados fundamentalmente por las fitohormonas SA, JA y etileno. Muchas de las proteínas PR son inducidas por el JA y el etileno, lo cual no ocurre de igual modo en todas las especies de plantas. De forma general se conoce que las rutas del JA y el etileno están activas en las etapas avanzadas, 30 dpi, de la Sigatoka negra en el cultivar susceptible ‘Grande naine’, lo cual está en correspondencia con la fase necrotrófica del ciclo de vida del patógeno (Portal *et al.*, 2011). En este trabajo se demostró la inducción temprana de los genes que codifican para *Lox1*, *Jar*, *PR1*, *PR4*, *PR10* y tipo *Germin*



**Figura 9.** Análisis de expresión los genes que codifican para *PR1*, *PR10*, Lipoxigenasa-1 (*Lox1*), *Jar1*, *Osmotina*, *PR4* y tipo *Germin* y *Actina* (gen de referencia) mediante RT-PCR en plantas del cv. ‘Grande naine’ asperjadas con JA (100  $\mu$ M) e inoculadas con una suspensión micelial de *Pseudocercospora fijiensis* (CCIBP-Pf-83). Los productos de amplificación, a las 12, 24, 48 y 72 h posteriores a la inoculación (hpi), se separaron por electroforesis en gel de

agarosa 1,5% y visualizado con bromuro de etidio. El control consistió de plantas sanas asperjadas con JA a las 24 h.

La enzima LOX está presente en la primera etapa de la ruta de biosíntesis del JA catalizando la oxigenación del ácido  $\alpha$ -linolenico, luego de ser liberado de la membrana plasmática, y los convierte en el ácido 13-hidroperoxilinolenico. Este constituye un paso limitante dentro de la ruta de biosíntesis del JA (Buchanan *et al.*, 2015). Por otra parte, la enzima Jar cataliza la conjugación del JA con el aminoácido isoleucina (Ile) dando como producto el jasmonoil-isoleucina (JA-Ile) (Buchanan *et al.*, 2015). Es evidente que tanto Jar1 como Lox1 constituyen enzimas claves en la ruta de biosíntesis del JA y por tanto han sido utilizadas como genes marcadores de esta ruta en varios estudios moleculares. Liu *et al.* (2016) incluyeron los genes *LOX* dentro de un estudio para desarrollar genes marcadores de la ruta del JA en el maíz. También, Naidoo (2011) utilizó estos genes en su estudio de perfiles de expresión de genes marcadores de las rutas del SA y del JA en *Eucalyptus grandis*. Por otra parte, Lopez-Raez *et al.* (2010) utilizaron ambos genes (*Lox* y *Jar1*) como parte de un estudio para comprobar la relación del JA en el proceso de simbiosis de las micorrizas. De acuerdo con el amplio conocimiento que existe de la ruta de biosíntesis del JA y del papel clave de las enzimas Lox y Jar1 en esta, decidimos utilizarlas como marcadores para comprobar la activación de la ruta en ambos tratamientos. En este experimento los genes *Lox1* y *Jar1* incrementaron su expresión en etapas tempranas de la interacción, favoreciendo así la resistencia a la Sigatoka negra por la ruta del JA, lo cual concuerda con los resultados observados en el acápite 4.1 y difiere de los resultados de Portal *et al.* (2011), que demostraron la inducción tardía del gen *Jar1* (30 dpi) para la interacción compatible *P. fijiensis*-'Grande naine'.

Generalmente, la inducción de las proteínas PR, es un evento tardío dentro de los mecanismos de defensa de las plantas susceptibles como el cultivar de banano 'Grande naine'. La aplicación de productos químicos o metabolitos derivados de microorganismos patógenos que pudieran simular una infección, puede inducir mecanismos de defensa como la producción de estas proteínas y la SAR (Sudisha *et al.*, 2011). En este sentido, la aplicación exógena de compuestos como SA y JA ha inducido la expresión de genes que codifican para estas proteínas en plantas de trigo, *Arabidopsis*, arroz, tabaco, tomate entre otras, y la resistencia en

estos casos fue efectiva frente a la infección por bacterias, virus y hongos (Heil y Bostock, 2002).

La actividad antifúngica de las PR4 está asociada a su capacidad de romper con la polaridad de la célula al unirse con la quitina de la pared celular del hongo. Estas proteínas son fundamentalmente inducidas por el ET (Yang y Gong, 2002, Portal *et al.*, 2011). Las osmotinas, que pertenecen a las PR5, poseen actividad antifúngica *in vitro* frente a varios tipos de patógenos, la cual aumenta cuando está en combinación con quitinasas y  $\alpha$ -glucanasas. Estas proteínas pueden interactuar con la membrana plasmática del patógeno y formar poros transmembranales, con la consecuente pérdida del material citoplasmático (Roberts y Selitrennikoff, 1990, Portal *et al.*, 2011). Según Rajam *et al.* (2007), la aplicación exógena de fitohormonas a plantas de trigo produce la acumulación de proteínas PR como las pertenecientes a las PR5 y  $\alpha$ -1,3-glucanasas, lo cual resulta en la reducción de la enfermedad causada por *Stagonospora nodorum* en comparación con las plantas no tratadas. En la interacción 'Grande naine', la osmotina posee elevados niveles de expresión tanto en plantas asperjadas con JA como en las plantas en las que se combinó el JA y la infección por *P. fijiensis*. Aunque se necesita comparar la expresión de este gen en plantas sanas y sin tratamiento hormonal, si es posible señalar que la alta expresión de este gen combinada con la PR4, pudiera garantizar daños a nivel de la membrana del hongo que limitan su desarrollo.

Los genes que codifican para las PR1 se han utilizado ampliamente como marcadores moleculares para indicar que está ocurriendo una respuesta de defensa en la planta. Las PR1 son generalmente inducidas por la ruta del SA. Las proteínas pertenecientes a este grupo son altamente resistentes a la proteólisis y son perfectamente adaptables al ambiente extracelular.

Las proteínas PR tipo Germin (PR15) son glicoproteínas y son responsables de la generación de especies reactivas del oxígeno luego de una infección por patógeno. Las germinas y otras proteínas tipo germinas han estado involucradas en la resistencia de las plantas al estrés biótico y abiótico. Las PR10 poseen actividad ribonucleasa. El JA y el ET pueden actuar de forma sinérgica para inducir algunas proteínas PR como las PR10 en plantas de *Arabidopsis* y tabaco. También, la conexión entre las rutas de estas dos fitohormonas incrementan los niveles de osmotinas (Bushnell *et al.*, 2003).

La resistencia de varios genotipos de bananos está relacionada con la rápida inducción y acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (primeras 72 h), en

contraste con la ocurrencia de estos procesos de forma tardía en genotipos susceptibles (Portal *et al.*, 2011). En el cultivar resistente ‘Calcutta 4’ se ha observado el incremento en la expresión de genes que codifican para algunas proteínas PR, como las PR1, PR4, PR10 y PR15 en etapas tempranas de la interacción incompatible con *P. fijiensis* (Torres *et al.*, 2012, Rodríguez *et al.*, 2016). En esta etapa temprana de la interacción que se corresponde con un estilo de vida biotrófico del patógeno, estos autores demostraron que las PR1 y la PR5 aumentaron los niveles de expresión a las 24 hpi, mientras que las PR4 fue regulada positivamente a las 6 y 12 hpi y la PR10 a las 18 y 24 hpi.

A estas etapas tan tempranas de la interacción *P. fijiensis*-‘Grande naine’, pudiera estar activada la ruta de biosíntesis del SA por la presencia del patógeno en la planta. Generalmente, esto conlleva a la inducción de mecanismos de defensa como la SAR y la expresión de genes que codifican para algunas proteínas PR como la PR1. Independientemente de que solo se realizó el tratamiento con la fitohormona JA, se puede inferir que la ruta del SA esta activada como respuesta al proceso de infección del hongo en su fase biotrófica. En las próximas 48 y 72 h se observa la disminución de la expresión de la PR1 lo cual pudiera sugerir que la ruta del JA estuviera teniendo una acción antagónica con la ruta del SA, proceso el cual ocurre en varios patosistemas.

Como habíamos visto, en el cultivar resistente ‘Calcutta 4’, la expresión de los genes que codifican para las PR1, PR4, PR5 y PR10 aumentan los niveles de expresión en horas muy tempranas de la interacción. En nuestro estudio, el comportamiento en los niveles de expresión de algunas proteínas PR es similar a los resultados obtenidos por Rodríguez *et al.* (2016) en un cultivar resistente. Estos resultados contrastan con la expresión tardía (30 dpi) de los genes que codifican para las PR4 y las PR5 en el cultivar ‘Grande naine’ informado por Portal *et al.* (2011).

La interacción de las plantas con microorganismos patógenos involucra la inducción de mecanismos de defensa que les permiten reducir los efectos negativos ocasionados por este tipo de estrés. Las fitohormonas median la adaptación rápida a las nuevas condiciones del ambiente. En este estudio, la aplicación exógena de JA redujo el índice de infección por *P. fijiensis* e indujo la expresión de genes relacionados con la ruta de síntesis del JA los genes que codifican para proteínas PR en el cultivar susceptible ‘Grande naine’, confiriéndole a la planta un mayor nivel de resistencia frente a la Sigatoka negra.

## **5. Conclusiones**

1. La aplicación exógena de JA y BTH disminuyen el índice de infección en el cultivar susceptible de 'Grande naine' infectado con *Pseudocercospora fijiensis*.
2. El tratamiento con JA confiere al cultivar 'Grande naine' una mayor resistencia a la enfermedad de la Sigatoka negra, pero requiere que la ruta del etileno este activada.
3. La aplicación exógena del JA en el cultivar 'Grande naine' infectado con *Pseudocercospora fijiensis* induce tempranamente la expresión de genes que codifican para las proteínas PR, favoreciendo así la resistencia a la Sigatoka negra.

## **6. Recomendaciones**

1. Analizar mediante PCR en tiempo real la expresión de los genes estudiados durante la interacción *Pseudocercospora fijiensis*-*Musa* spp.
2. Realizar estudios moleculares para corroborar el papel del etileno del SA en la respuesta de defensa del cultivar 'Grande naine' frente a la Sigatoka negra, así como su interacción con la ruta del JA.
3. Tener en cuenta los resultados obtenidos para la búsqueda de alternativas en el control de la Sigatoka negra y el mejoramiento genético del cultivar 'Grande naine'.

## 7. Referencias bibliográficas

- Agrios, G. N. (2005) *Plant Pathology* Academic Press Inc. San Diego, USA.
- Alazem, M. y Lin, N.-S. (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host–virus interactions. *Molecular Plant Pathology*. 16: 529–540.
- Alvarado-Capó, Y., Mora, M. L., Rodríguez, M. A. D., Acosta, M., Cruz, M., Portal, N., Kosky, R. G., García, L., Bermúdez, I. y Padrón, J. (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*. pp. 169–175.
- Alvindia, D. G. (2012) Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*, the causal pathogen of black Sigatoka and leaf spot of banana. *African Journal of Microbiology Research*. 6: 4179-4184.
- Anderson, J., Badruzaufari, E., Schenk, P., Manners, J. y Desmond, O. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16: 3460–3479.
- Argent, G. C. G. (1976) The wild bananas of Papua New Guinea. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh*. 35: 77-114.
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P. y Pilkauskas, P. (2003) The world banana economy forum 1985–2002. In: *Rome: Food 2 and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Arzanlou, M., Abeln, E. C. A., Kema, G. H. J., Waalwijk, C., Carlier, J., Vries, I. d., Guzman, M. y Crous, P. W. (2007) Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*. 97: 1112–1118.
- Arzanlou, M., Groenewald, J. Z., Fullerton, R. A., Abeln, E. C. A., Carlier, J., Zapater, M. F., Buddenhagen, I. W., Viljoen, A. y Crous, P. W. (2008) Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*. 20: 19-37.
- Arzate-Vega, J., Domínguez-Márquez, V. M. y Santos-Eméstica, O. A. (2006) Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) in vitro e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24: 98-104.
- Bari, R. y Jones, J. D. G. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant and Molecular Biology*. 69: 473–488.
- Bayer (2007) Protecting a tropical treasure the Banana. *COURIER*. 1: 2-7.
- Bellaire, L. d. L. D., Foure, E., Abadie, C. y Carlier, J. (2010) Black leaf streak disease is challenging the banana industry. *Fruits*. 65: 327-342.
- Berg, N. v. d., Berger, D. K., Hein, I., Birch, P. R. J., Wingfield, M. J. y Viljoen, A. (2007) Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Molecular Plant Pathology*. 8: 333–341.
- Bernier, F. y Berna, A. (2001) Germins and germin-like proteins Plant do-all proteins. But what do they do exactly. *Plant physiology and biochemistry*. 39: 545–554.
- Boller, T. y Felix, G. (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379-406.

- Boller, T. y He, S. Y. (2009) Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324: 742-744.
- Bolton, M. D. (2009) Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 487-497.
- Broekaert, W., Delaure, S., Bolle, M. D. y Cammuel, B. (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 44: 393-416.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W. y Jones, R. L. (2015) *Biochemistry & molecular biology of plants*. Second Edition.
- Bushnell, W., Hazen, B., Pritsch, C. y Leonard, K. (2003) Histology and physiology of *Fusarium* head blight. *Fusarium* head blight of wheat and barley: 44-83.
- Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á. y Moreno, A. (2016) Reactive oxygen species, essential molecules, during plant-pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 10-23.
- Caplan, J. L., Kumar, A. S., Park, E., Padmanabhan, M. S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K. y Dinesh-Kumar, S. P. (2015) Chloroplast stromules function during innate immunity. *Developmental Cell*. 34: 45-57.
- Carlier, J., Fouré, E., Gauhl, F., Jones, D. R., Lepoivre, P., Mourichon, X., Pasberg-Gauhl, C. y Romero, R. A. (2000) *Black leaf streak* New York: CABI Publishing, 37-79 pp.
- Carvalho, A. d. O. y Gomes, V. M. (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review. *Peptides*. 28: 1144-1153.
- Castañeda, N. E. N., Alves, G. S. C., Almeida, R. M., Amorim, E. P., Ferreira, C. F., Togawa, R. C., Costa, M. M. D. C., Grynberg, P., Santos, J. R. P., Cares, J. E. y Miller, R. N. G. (2017) Gene expression analysis in *Musa acuminata* during compatible interactions with *Meloidogyne incognita*. *Annals of Botany* 119: 915-930
- Castresana, C. (2013) *Señales celulares implicadas en la activación de la inmunidad vegetal*. [En línea] Disponible desde. [Consultado].
- Cavalcante, M. J. B., Escoute, J., Madeira, J. P., Romero, R. A., Nicole, M. R., Oliveira, L. C., Hamelin, C., Lartaud, M. y Verdeil, J. L. (2011) Reactive oxygen species and cellular interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and banana. *Tropical Plant Biology*. 4: 134-143.
- Cheesman, E. E. (1947) Classification of the Bananas: The Genus *Musa* L. *Royal Botanic Gardens, Kew*. 2: 106-117.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H. y Lin, H. (2009) ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 21: 2527-2540.
- Churchill, A. C. L. (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12: 307-328.
- Crous, P. W. y Mourichon, X. (2002) *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. nov.: causal agent of eumusae leaf spot disease of banana. *Sydowia* 54: 35-43.
- Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Slippers, B. y Wingfield, M. J. (2016) Global food and fibre security threatened by current inefficiencies in fungal identification. *Philosophical Transactions Royal Society B*. 371: 20160024.

- Dahl, C. V. y Baldwin, I. (2007) Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26: 201–209.
- Donzelli, B. G. G. y Churchill, A. C. L. (2007) A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathology* 97: 916-929.
- Echeverri, F., Torres, F., Quiñones, W., Escobar, G. y Archbold, R. (2012) Phenylphenalenone phytoalexins, will they be a new type of fungicide? *Phytochemistry Reviews* 11: 1–12.
- Etebu, E. y Young-Harry, W. (2011) Control of black Sigatoka disease: Challenges and prospects. *African Journal of Agricultural Research*. 6: 508-514.
- Eulgem, T. y Somssich, I. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 366–371.
- FAOSTAT (2014) *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [En línea] Disponible desde. [Consultado].
- FAOSTAT (2016) *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. [En línea] Disponible desde. [Consultado].
- Ferreira, R. B., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C. N., Chen, Z., Batista, L. M., Duarte, J., Borges, A. y Teixeira, A. R. (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular plant pathology* 8: 677–700.
- Fouré, E. (1985) Black leaf streak disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. *IRFA*. 23.
- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Ploetz, R. C., Gordon, T. R. y Viljoen, A. (2011) Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis cubense within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 533-542.
- Foyer, C. H. y Noctor, G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 861–905.
- FRAC-Code-List. (2018) Fungicides sorted by mode of action. *FRAC Code List*.: 1-14.
- Friesen, T. L. (2016) Combating the Sigatoka disease complex on banana. *PLoS Genet*. 12: 1-4.
- Fullerton, R. A. y Olsen, T. L. (1995) Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science*. 23: 39-48.
- Gamalero, E. y Glick, B. (2012) Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. In: *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. New York: Springer. 395–412.
- Gasparotto, L., Pereira, J. C. R., Urben, A. F., Hanada, R. E. y Pereira, M. C. N. (2005) *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka-negra da bananeira. *Fitopatologia Bras*. 30: 423–425.
- Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C. y Jones, D. R. (2000) *Black leaf streak:disease cycle and epidemiology*New York: CABI Publishing, 56–62 pp.
- Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (2007) Pathogenesis-Related proteins in roots: a role in plant resistance or epiphenomenon? *Convenor of the working group “Induced Resistance in Plants Against Insects and Diseases” of the International Organisation of Biological Control*
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 205-227.

- Güerere-Pereira, P., Martínez, I. y Fuenmayor, L. (2008) Efecto del deshoje inducido sobre la productividad del plátano (*Musa* AAB) cv. 'Hartón' y la incidencia de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)*. 25: 636-648.
- Guerrero, J. Q., Noblecilla, C. J. C. I. y Batista, R. M. G. (2018) Effect of the predominant use of systemic fungicides for the control of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in the foliate area of the banana. *Revista Científica Agroecosistemas*. 6: 128-136.
- Guest, D. y Brown, J. (2000) Plant defences against pathogens.
- Guevara, C. A., Arenas, H. A., Mejía, A. y Peláez, C. A. (2012) Biogas and bioethanol production from non-exportable low quality banana. *Biotecnología Vegetal*. 23: 19-30.
- Gutierrez-Monsalve, J.A., Mosquera, S., González-Jaramillo, L.M., Mira, J.J. y Villegas-Escobar, V. (2015) Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EACB0015 culture *Biological Control* 87: 39-46.
- He, P., Shan, L. y Sheen, J. (2007) Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microorganismology* 9: 1385-1396.
- Heath, M. C. (2000) Nonhost resistance and non-specific plant defences. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 315-319.
- Heil, M. y Bostock, R. (2002) Induced systemic resistance in the context of induced plant defenses *Annuals of Botany*. 89: 503-512.
- Helliot, B., Panis, B., Poumay, Y., Swennen, R., Lepoivre, P. y Frison, E. (2002) Cryopreservation for the elimination of Cucumber mosaic and Banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports*. 20: 1117-1122.
- Hernández, A. y Pérez, L. (2001) Reaction of banana and plantain cultivars to black Sigatoka disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Epidemiological components of the resistance. *Fitosanidad*. 5: 9-15.
- Hernández, I., Portieles, R., Chacón, O. y Borrás-Hidalgo, O. (2005) Proteins and peptides for the control of phytopathogenic fungi. *Biotecnología Aplicada* 22: 256-260.
- Heslop-Harrison, J. S. y Schwarzacher, T. (2007) Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*. 100: 1073-1084.
- Hewitt, H. (1998) Fungicides in crop protection. *CAB International, Wallingford, UK*. 221.
- Hidalgo, W., Duque, L., Saez, J., Arango, R., Gil, J., Rojano, B., Schneider, B. y Otálvaro, F. (2009) Structure-activity relationship in the interaction of substituted perinaphthenones with *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 7417-7421.
- Hidalgo, W., Chandran, J. N., Menezes, R. C., Otálvaro, F. y Schneider, B. (2016) Phenylphenalenones protect banana plants from infection by *Mycosphaerella fijiensis* and are deactivated by metabolic conversion. *Plant, Cell & Environment*. 39: 492-513.
- Hogenhout, S. A. y Bos, J. I. (2011) Effector proteins that modulate plant-insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 422-428.
- Hoss, R., Helbig, J. y Bochow, H. (2000) 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* 148: 387-394.

- Hu, X., Bidney, D.L., Yalpani, N., Duvick, J.P., Crasta, O., Folkerts, O. y Lu, G. (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*. 133: 170–181.
- Isaza, R.E.A., Diaz-Trujillo, C., Aerts, X.B., Aerts, A.J.C., Crane, C.F., Jong, T.V.d., Vries, I. d., Dietrich, R., Farmer, A.D., Ferreira, C.F., Garcia, S., Guzman, M., Hamelin, R.C., Lindquist, E.A., Mehrabi, R., Quiros, O., Schmutz, J., Shapiro, H., Reynolds, E., Scalliet, G., Souza, M.J., Stergiopoulos, I., Lee (2016) Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *PLoS Genetics*. 12.
- Iwai, T., Miyasaka, A., Seo, S. y Ohashi, Y. (2006) Contribution of ethylene systemic induced defense against Root Knot Nematodes in Rice biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiology*. 142: 1202–1215.
- Jaillais, Y. y Chory, J. (2010) Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature structural & molecular biology*. 17: 642–645.
- Johanson, A. y Jeger, M. J. (1993) Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *Musamusicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycology Research*. 97: 670-674.
- Jones, J. D. G. y Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature*. 444: 323–329.
- Jorda, L., Conejero, V. y Vera, P. (2000) Characterization of P69E and P69F, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant physiology* 122: 67–73.
- Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E.J. y Klessig, D.F. (2001) A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Plant Biology*. 98: 9448–9453
- Kangasjärvi, S., Tikkanen, M., Durian, G. y Aro, E.-M. (2014) Photosynthetic light reactions - an adjustable hub in basic production and plant immunity signaling. *Plant Physiology and Biochemistry*. 81: 128–134.
- Langhe, E.d., Vrydaghs, L., Maret, P.D., Perrier, X. y Denham, T. (2009) Why bananas matter: An introduction to the history of banana domestication. *Ethnobotany research and applications*. 7: 165-177.
- Lata, C. y Prasad, M. (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of experimental botany*. 62: 4731–4748.
- Leiva-Mora, M., Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Sánchez-García, C. y Roque, B. (2010) Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biotecnología Vegetal* 10: 79 - 88.
- Lepoivre, P., Busogoro, J.P., J.J Etame, J.J., Hadrami, A.E., Carlier, J., Harelimana, G., Mourichon, X., Panis, B., Riveros, A.S., Salle, G., Strosse, H. y Swennen, R. (2003) *Banana-Mycosphaerella fijiensis* interactions San José, Costa Rica, 151-159 pp.
- Liu, F., Zhang, Y., Sun, Q.-Y., Yang, F.-M., Gu, W., Yang, J., Niu, H.-M., Wang, Y.-H. y Long, C.-L. (2014) Diarylheptanoids and phenylphenalenones from *Musa* itinerans fruits. *Phytochemistry*. 103: 171-177.
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Kazan, K. y Schenk, P.M. (2016) Development of marker genes for jasmonic acid signaling in shoots and roots of wheat. *Plant Signaling & Behavior*. 11.
- Loon, L. C. v., Rep, M. y Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *The Annual Review of Phytopathology*. 44: 135-162.

- Lopez-Raez, J.A., Verhage, A., Garcia, I.M., Azcon-Aguilar, C., Flors, V. y Pozo, M.J. (2010) Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany*. 61: 2589-2601.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. y Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*. 15: 165–178.
- Magee, C. J. P. (1953) Some aspects of the bunchy top disease of banana and other *Musa* spp. *Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales*. 87: 3-18.
- Manzo-Sánchez, G., González, S.G., García, C.M.R., James, A. y Santos, M.O. (2005) La biología de *Mycosphaerella fijiensis* y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 87-96.
- Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M. y Sutton, T.B. (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87.
- Martín, M.C., Capó, Y.A., Suárez, M.A., Leiva, M. y Roque, B. (2004) Caracterización de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet para su utilización en programas de mejoramiento de *Musa* sp. *Biotecnología vegetal*. 4: 111-114.
- Martínez, E. y González, M. (2007) *Instructivo técnico del cultivo del plátano*. 1ra. La Habana.
- Martínez, I., Villalta, R., Soto, E., Murillo, G. y Guzmán, M. (2011) Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano.
- McDowell, J.M. y Dangl, J.L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*. 25: 79–82.
- Mckinney, H.H. y Davis, R.J. (1925) Influence of soil temperature and moisture on infection of young wheat plants by *Ophiobolus graminis*. *Journal of Agricultural Research*. 31: 827-840.
- Melchers, L.S. y Stuiver, M.H. (2000) Novel genes for disease-resistance breeding. *Plant Biotechnology*. 3: 147–152.
- Mendoza-Rodríguez, M.F., Portal, O., Oloriz, M.I., Ocaña, B., Rojas, L.E., Acosta-Suárez, M., Roque, B., Canales, E., Borrás-Hidalgo, O. y Jiménez, E. (2018) Early regulation of primary metabolism, antioxidant, methyl cycle and phenylpropanoid pathways during the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. interaction. *Tropical plant pathology*.
- Mizoi, J., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012) AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et biophysica acta-Bioenergetics* 1819: 86–96.
- Moffatt, B.A. y Weretilnyk, E.A. (2001) Sustaining S-adenosylmethionine dependent methyl transferase activity in plant cells. *Physiologia Plantarum* 113: 435–442.
- Nahar, K., Kyndt, T., Vleeschauwer, D.D., Hofte, M. y Gheysen, G. (2011) The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in Rice. *Plant Physiology*. 157: 305–316.
- Naidoo, R. (2011) Expression profiling marker genes of the salicylic acid and methyl jasmonate signalling pathways in *Eucalyptus grandis*. In: *Departement of genetics* University of Pretoria
- Nakashima, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports*. 32: 959–970.

- Nel, B., Steinberg, C., Labuschagne, N. y Viljoen, A. (2006) Isolation and characterization of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from the rhizosphere of healthy banana plants. *Plant Pathology*. 5: 207-216.
- Nelson, S. (2008) Black leaf streak of banana. *Plant Disease*.
- O.Lorenzo, Chico, J., Sanchez-Serrano, J. y Solano, R. (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16: 1938–1950.
- Ochoa, A. D. (2002) Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*. *Fitosanidad*. 7: 45.
- Ojito-Ramos, K. y Portal, O. (2010) Introducción al sistema inmune en plantas. *Bioteología Vegetal*. Vol. 10.
- Orellana, P. (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. . pp. 120.
- Park, S.-W., Vepachedu, R., Sharma, N. y Vivanco, J. M. (2004) Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta*. 219: 1093–1096.
- Passardi, F., Penel, C. y Dunand, C. (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in plant science*. 9: 534–540.
- Passos, M. A., Oliveira, C. V. d., Emediato, F. L., CamargoTeixeira, C. d., Souza, M. T., Matsumoto, T., Azevedo, V. C. R., Ferreira, C. F., Amorim, E. P., Figueiredo, L. F. d. A., Martins, N. F., MdJB, C., Baurens, F.-C., Silva, O. B. d., Pappas, G. J., Pignolet, L., Abadie, C., Ciampi, A. Y., Piffanelli, P. y Miller, R. N. (2012) Development of expressed sequence tag and expressed sequence tag–simple sequence repeat marker resources for *Musa acuminata*. *AoB Plants*.
- Pérez-Vicente, L. (2012) A holistic integrated management approach to control black Sigatoka disease of banana caused by *Mycosphaerella fijiensis*. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Pérez, L., Álvarez, J. M. y Pérez, M. (2003) Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en Cuba: Impacto económico, resistencia de los clones y manejo de la enfermedad. *Fitosanidad*. 7: 31-41.
- Pieterse, C., A. Leon-Reyes A, Ent, S. V. d. y Wees, S. V. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5: 308–316.
- Ploetz, R. (2001) Black Sigatoka of banana: The most important disease of a most important fruit. *The Plant Health Instructor*.
- Ploetz, R.C., Thomas, J.E. y Slabaugh, W.R. (2003) *Diseases of banana and plantain* Cambridge, MA: CABI Publishing, 73–134 pp.
- Portal, O. (2009) Development of Molecular Tools to Study the Interaction Between Banana and *Mycosphaerella fijiensis*, the Causal Agent of Black Leaf Streak Disease. . Ghent University.
- Portal, O., Izquierdo, Y., Vleeschauwer, D.D., Sanchez-Rodriguez, A., Mendoza-Rodriguez, M., Acosta-Suarez, M., Ocana, B., Jimenez, E. y Hofte, M. (2011) Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*–banana interaction. *Plant Cell Reports*. 30: 913–928.
- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., Vos, M.D., Pieterse, C. y Memelink, J. (2008) The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology*. 147: 1347–1357.

- Quiñones, W., Escobar, G., Echeverri, F., Torres, F., Rosero, Y., Arango, V., Cardona, G. y Gallego, G. (2000) Synthesis and antifungal activity of *Musa* phytoalexins and structural analogs. *Molecules* 5: 974-980.
- R.Granda, Diana, M., Mejía, G., Amanda, I., Jiménez, T. y Gloria, A. (2005) Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *VITAE, revista de la facultad de Química Farmacéutica*. 12: 13-20.
- Rajam, M. V., CHANDOLA, N., goud, P. S., Singh, D., Kashyap, V., Choudhary, M. L. y SIHACHAKR, D. (2007) Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Biologia plantarum* 51: 135-141.
- Rawal, R. D. (1996) *Fungal disease of banana: Current scenario in India*Gurgaon: AIPUB NHB.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M. y Jones, J. (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annual Review of Phytopathology*. 49: 317–343.
- Roberts, W. y Selitrennikoff, C. (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane permeabilizing activity. *J Gen Microbiology*. 136: 1771–1177.
- Rodriguez, H. A., Rodriguez-Arango, E., Morales, J. G., Kema, G. y Arango, R. E. (2016) Defense gene expression associated with biotrophic phase of *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet infection in banana. *Plant Disease* 100: 1170–1175.
- Rodríguez, H. A., Rodríguez-Arango, E., Morales, J. G., Kema, G. y Arango, R. E. (2016) Defense gene expression associated with biotrophic phase of *Micosphaerella fijiensis* M. Morelet infection in Banana *Plant Disease*. 100: 1170-1175.
- Roux, N., Baurens, F. C., Heslop-Harrison, P., Town, C., Sasaki, T., Matsumoto, T., Aert, R., Remy, S., Souza, M. y Lagoda, P. (2008) *Genomics of banana and plantain (Musa spp.), major staple crops in the tropics*.
- Sato, M., Tsuda, K., Wang, L., Collier, J. y Watanabe, Y. (2010) Network modeling reveals prevalent negative regulatory relationships between signaling sectors in *Arabidopsis* immune signaling. *PLoS Pathogen*. 6.
- Selitrennikoff, C. P. (2001) Antifungal proteins. *Applied and environmental microbiology*. 67: 2883-2894
- Sels, J., Mathys, J., Coninck, B. M. A. D., Cammue, B. P. A. y Bolle, M. F. C. D. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR pe ptides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 941–950.
- Serrano, I., Audran, C. y Rivas, S. (2016) Chloroplasts at work during plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany* 67: 3845–3854.
- Shekhawat, U. K. S. y Ganapathi, T. R. (2013) *Musa*WR KY71 overexpression in banana plants leads to altered abiotic and biotic stress responses. *PLoS ONE*. 8: 1-7.
- Stansbury, C., McKirdy, S. y Power, G. (2000) Black sigatoka *Mycosphaerella fijiensis*. Exotic threat to Western Australia.
- Stec, B. (2006) Plant thionins – the structural perspective. *Cellular and molecular life sciences*. 63 1370–1385.
- Stergiopoulos, I., Collemare, J., Mehrabi, R. y Wit, P. J. G. M. D. (2013) Phytotoxic secondary metabolites and peptides produced by plant pathogenic *Dothideomycete fungi*. *FEMS Microbiol Reviews* 37: 67–93.

- Stover, R. H. (1972) *Banana, Plantain and Abaca Diseases*. 1ra. The Eastern Press, London, UK.
- Stover, R. H. (1978) Distribution and probable origin of *Mycosphaerella fijiensis* in southeast Asia. *Tropical Agriculture*. 55: 65–68.
- Sudisha, J., Sharathchandra, R. G., Amruthesh, K. N., Kumar, A. y Shetty, H. S. (2011) Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. pp. 379-403.
- Talwana, H. L., Speijer, P. R., Gold, C., Swennen, R. y Waele, D. D. (2006) Effect of nematode infection and damage on the root system and plant growth of three *Musa* cultivars commonly grown in Uganda. *Nematology*. 8: 177-189.
- Theis, T. y Stahl, U. (2004) Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and molecular life sciences*. 61: 437–455.
- Thordal-Christensen, H. (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 351-357.
- Torres, J. M., Calderón, H., Rodríguez-Arango, E., Morales, J. G. y Arango, R. (2012) Differential induction of pathogenesis-related proteins in banana in response to *Mycosphaerella fijiensis* infection. *Plant Pathology* 133: 887–898.
- van Loon, L. C., Rep, M. y Pieterse, C. M. J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Verberne, M., Hoekstra, J., Bol, J. y Linthorst, H. (2003) Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant Journal* 35: 27–32.
- Verma, V., Ravindran, P. y Kumar, P. P. (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology* 16: 86–96.
- Villalta, R. y Guzmán, M. (2008) Evaluación de Microorganismos Eficaces y *Trichoderma* como agentes de control biológico de la Sigatoka negra en banano (*MusaAAA*) Guácimo, Costa Rica.
- Vos, M. D., Zaanen, W. V., Koornneef, A., Korzelius, J. y Dicke, M. (2006) Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 142: 352–363.
- Wong, C., Kiew, R., Argent, G. C. G., Set, O., Lee, S. K. y Gan, Y. Y. (2002) Assessment of validity of the sections in *Musa* (*Musaceae*) using AFLP. *Annals of Botany* 90: 231-238.
- Wu, J. y Baldwin, I. T. (2010) New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.* 44: 1-24.
- Xu, J. y Zhang, S. (2015) Ethylene biosynthesis and regulation in plants. En: Wen, C.-K. (ed.). *Ethylene in Plants*. pp. 1-25: Springer Netherlands.
- Yang, Q. y Gong, Z. (2002) Purification and characterization of an ethylene-induced antifungal protein from leaves of guelder rose (*Hydrangea macrophylla*). *Protein Expression Purification*. 24: 76–82.
- Yeats, T. H. y Rose, J. K. C. (2008) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein science*. 17: 191–198.
- Yu, X.-M., Griffith, M. y Wiseman, S. B. (2001) Ethylene induces antifreeze activity in winter *Rye leaves*. *Plant physiology*. 126: 1232–1240.
- Yuan, J., Sun, K., Deng-Wang, M.-Y. y Dai, C.-C. (2016) The mechanism of ethylene signaling induced by endophytic fungus *Gilmaniella* sp. AL12 mediating sesquiterpenoids biosynthesis in *Atractylodes lancea*. *Frontiers in Plant Science*. 7: 361.

- Zhao, M.-L., Wang, J.-N., Shan, W., Fan, J.-G., Kuang, J.-F., Wu, K.-Q., Li, X.-P., Chen, W.-X., He, F.-Y., Chen, J.-Y. y Lu, W.-J. (2013) Induction of jasmonate signalling regulators MaMYC2s and their physical interactions with MaICE1 in methyl jasmonate-induced chilling tolerance in banana fruit. *Plant, Cell and Environment*. 1-22.
- Zhou, J., Jia, F., Shao, S., Zhang, H., Li, G., Xia, X., Zhou, Y., Yu, J. y Shi, K. (2015) Involvement of nitric oxide in the jasmonate-dependent basal defense against root-knot nematode in tomato plants *Frontiers in Plant Science*. 6: 193.