



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRISLISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

**Caracterización molecular de la interacción *Musa acuminata* -
Mycosphaerella fijiensis Morelet**

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Lic. Milady Francisca Mendoza Rodríguez, MSc.

Santa Clara

2013

**UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS**

**Caracterización molecular de la interacción *Musa acuminata* -
Mycosphaerella fijiensis Morelet**

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Lic. Milady Francisca Mendoza Rodríguez, MSc.

Tutores: Inv. Titular, Ing. Elio A. Jiménez González, Dr. C.
Inv. Agregado, Lic. María I. Oloriz Ortega, Dr. C.

Santa Clara

2013

Al mayor tesoro de mi vida:

Mi familia

Resulta difícil el poder resumir en palabras el agradecimiento que le tengo a tantas personas, pero de este modo les hago llegar mi más sincero reconocimiento.

- Al consejo de Universidades Flamencas de Bélgica a través del programa de cooperación institucional.

- A la Dra. Tatiana Pugh, Decana de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical, en Venezuela, por haberme recibido con mucho amor para la realización de mi investigación.

- A todos los compañeros del laboratorio de Genómica Funcional de Plantas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, por apoyarme en la culminación de los experimentos de esta investigación.

- A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de tantos años, Bárbara Ocaña, Luis Rojas, Neyda Bacallao y José M. Machado, por su constante apoyo para que culmine esta tesis. También, a los nuevos integrantes del mismo como Borys, Mayrenis, Leonardo, Dalia, Raúl y otros más que trabajan en el laboratorio. No puedo dejar de mencionar a Aminael Sánchez y Yovanny Izquierdo, valiosos muchachos jóvenes muy capaces quienes me apoyaron en todo lo necesario en el momento preciso. A todos ellos mis más sinceros agradecimientos.

- Entre todos, Baby merece mi mayor admiración pues es esa persona que con su nobleza, espíritu y sobretodo sinceridad, no ha escatimado nada para poder ayudarme y aconsejarme.

- A Eduardo Cruz (papicho) por ser un ser humano tan inspirador en la vida.

- A las chicas del Laboratorio de Microbiología Aplicada Mayra y Belkis por su ayuda, dedicación y gran contribución para la realización de esta tesis. Que puedo decir de Mileidy, esa muchacha tan entusiasta y capaz, que me ha ayudado tanto en los últimos meses y hasta el último momento. A los doctores Michel y Yelenys, por haber recibido de

ellos por tantos años mucho optimismo, ideas y apoyo para la culminación de mi tesis doctoral.

- A Novisel, esa muchacha tan noble, preparada que vino espontáneamente a mí y que con su gran ayuda contribuyó a la mejor organización del documento de tesis, no hay palabras para expresar tanto agradecimiento.

- Al Dr. Elio Jiménez, mi tutor, por haber sido el líder de este proyecto de investigación y contribuir en mi formación profesional a lo largo de todos estos años. Bajo su orientación, visión y carisma, finalmente he podido concluir el documento de tesis.

- A la Dra. María I. Oloriz, tutora también de la tesis, después de tantos años juntas desde que comenzamos la universidad en el año 1987, ha sido la persona determinante en la culminación de este documento. Con su capacidad, profesionalismo, conocimiento y experiencia científica adquirida, logró guiarme e incitarme para la finalización de esta tesis. Muchas gracias de todo corazón.

-A Orelvis Portal, ese muchacho que aunque a última hora se enreda siempre, su conocimiento, virtuosismo y preciosismo lo hacen sobresalir además de, haber sido un gran apoyo para la terminación de este documento.

- A los compañeros de la biblioteca. Osmildo, un gran amigo por su dedicación, paciencia incondicionalidad para conmigo, por estar ahí cada día apoyándome. A Marta, por ser también esa compañera tan cooperativa y servicial no solo por su trabajo, sino en lo personal.

- A Laureano, un gran amigo al que quiero inmensamente, por alentarme cada día para seguir adelante y del cual las palabras no podrían reflejar todo lo que siento.

- A mis padres, hermanas y familia en general, por todo su amor y apoyo constante, por ser el motor impulsor de esta ardua tarea.
- A mis buenos amigos y amigas, José A., Hernán, Ana, Nayuf, Raquel, Dorin, Stephanie, Ilquia, Tina, Reldis.
- A Humberto Mora, un buen amigo que me ha apoyado todo este tiempo sin reparos de ninguna índole.
- A todos los trabajadores de la fase de aclimatización de los cuales recibí mucha ayuda para lograr el mejor cuidado de las plantas.
- En fin, a todos los trabajadores del IBP que de una forma u otra han propiciado la culminación de esta investigación.

A todos,

Muchas Gracias

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
Apx	Ascorbato peroxidasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Cat	Catalasa
C4h	Cinamato 4 hidroxilasa
Chs	Chalcona sintasa
dpi	Días posteriores a la inoculación
ESTs	Secuencias blanco expresadas
HR	Respuesta hipersensible
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
Irl	Similar a la isoflavona reductasa
Mt	Metalotionina
O₂^{·-}	Superóxido
OH[·]	Hidroxilo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pox	Peroxidasa
PsI	Subunidad N del centro de reacción del fotosistema I
PsII	Polipéptido del fotosistema II 10 kDa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Sam	S-adenosilmetionina
Sams	S-adenosilmetionina sintetasa
SSH	Hibridación sustractiva por supresión
Trx	Tioredoxina

RECURSOS INFORMÁTICOS

- **CAP3**: Programa de ensamblaje de secuencias (del inglés: *Sequence Assembly Program*).
<http://www.pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>.
- **MIPS**: Centro de información de secuencias de proteínas en Munich (del inglés: *Munich Information Center for Protein Sequences*).<http://www.mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>.
- **NCBI**: Centro Nacional de Información para la Biotecnología (del inglés: *National Center of Biotechnology Information*). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- **Primer3**: Programa bioinformático de diseño de cebadores para PCR.
<http://www.simgene.com/primer3>.
- **VecScreen**: Sistema para la identificación de segmentos de secuencias de ácido nucleico que puedan pertenecer al vector. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>.
- Genoma completo de referencia de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang ('DH Pahang'). <http://banana-genome.cirad.fr>.

SÍNTESIS

El rayado negro de la hoja causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton], se considera la enfermedad foliar más destructiva y costosa de los cultivos de bananos y plátanos. En el presente trabajo, para la identificación de genes asociados con la resistencia a esta enfermedad, se construyó una biblioteca de ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc) del tipo sustractiva, en el cultivar resistente 'Calcutta 4' (*Musa AA*) frente a *M. fijiensis* y se obtuvieron secuencias blanco expresadas (ESTs, del inglés: *Expressed Sequence Tags*) las cuales se ubicaron en las categorías funcionales: fotosíntesis y energía, estrés oxidativo, metabolismo, mantenimiento celular, transporte, elementos transponibles, defensa, destino de proteínas, transducción de señales y tráfico intracelular. Se realizó un estudio de expresión por PCR en tiempo real en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* y en la compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* a diferentes días posteriores a la inoculación, que incluyó ESTs de la biblioteca y otras derivadas de la ruta de fenilpropanoides. Los perfiles de expresión de genes obtenidos en la interacción incompatible evidenciaron una rápida respuesta, caracterizada por la activación del metabolismo, la producción de compuestos fenólicos y de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*). Al parecer, una explosión oxidativa en un estadio temprano de la infección podría estar asegurando los niveles de ROS, para desencadenar una defensa efectiva, lo cual coincidió con la máxima acumulación del anión superóxido y de actividad peroxidasa. En la interacción compatible los niveles de cambio de los genes podría no garantizar la resistencia de las plantas. Los resultados alcanzados con el estudio a nivel molecular de la interacción, aportaron nuevos elementos relacionados con la respuesta de defensa en plantas de banano ante la infección con este patógeno.

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. <i>Musa spp.</i>	6
2.1.1. Importancia de los bananos y plátanos.....	6
2.1.2. Origen y distribución.....	6
2.1.3. Taxonomía y diversidad genética.....	6
2.1.4. Características del banano silvestre diploide ‘Calcutta 4’ (<i>Musa acuminata ssp. burmannicoides</i>).....	7
2.1.5. Enfermedades en <i>Musa spp.</i>	8
2.2. Enfermedad del rayado negro de la hoja en <i>Musa spp.</i>	9
2.2.1. Agente causal.....	9
2.2.2. Origen y distribución.....	9
2.2.3. Modo de infección y sintomatología.....	10
2.2.4. Epifitiología.....	12
2.2.5. Medidas de control.....	12
2.3. Interacción planta-microorganismo	15
2.3.1. Elementos de la interacción planta-microorganismo.....	15
2.3.2. Importancia del estudio molecular de efectores y proteínas R.....	18
2.3.3. Resistencia inducida.....	18
2.4. Interacción <i>Musa spp.</i>-<i>M. fijiensis</i>	22
2.4.1. Tipos de interacción.....	22
2.4.2. Genética de la resistencia propuesto para cultivares resistentes en <i>Musa spp.</i>	23
2.4.3. Herramientas moleculares y bioinformáticas en el estudio del género <i>Musa spp.</i>	23
2.5. Avances en el mejoramiento genético de <i>Musa spp.</i> relacionado con la enfermedad del rayado negro de la hoja	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Identificación de transcritos de genes expresados en plantas de ‘Calcutta 4’ en un estadio temprano de la infección con <i>M. fijiensis</i>	29

3.1.1. Construcción de una biblioteca SSH.....	31
3.1.2. Secuenciación y análisis de la biblioteca SSH.....	35
3.2. Análisis cuantitativo de la expresión de las ESTs seleccionadas de la biblioteca SSH obtenida a partir de plantas de ‘Calcutta 4’ inoculadas con <i>M. fijiensis</i>.....	37
3.2.1. Determinación de compuestos bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo, en plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ inoculadas con <i>M. fijiensis</i>	41
3.3. Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides.....	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1. Obtención de transcriptos de genes expresados en plantas de ‘Calcutta 4’ en un estadio temprano de la infección con <i>M. fijiensis</i>...	44
4.1.1. Construcción de una biblioteca SSH.....	44
4.1.2. Secuenciación y análisis de la biblioteca SSH.....	44
4.2. Análisis cuantitativo de la expresión de las ESTs seleccionadas de la biblioteca SSH obtenida a partir de plantas de ‘Calcutta 4’ inoculadas con <i>M. fijiensis</i>.....	55
4.2.1. Determinación de compuestos bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo, en plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ inoculadas con <i>M. fijiensis</i>	69
4.3. Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides.....	74
5. CONCLUSIONES.....	84
6. RECOMENDACIONES.....	86
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8. ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) constituyen el alimento fundamental para alrededor de 400 millones de personas en el mundo. Se cultivan en más de 100 países en regiones tropicales y subtropicales y su producción anual estimada es superior a los 140 millones de toneladas (FAOSTAT, 2011).

El rayado negro de la hoja, también conocida como Sigatoka negra, causada por el ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton], se considera la enfermedad foliar más destructiva y costosa de los cultivos de bananos y plátanos a nivel mundial.

Su aparición en Cuba, descrita por Vidal (1992), tuvo un gran impacto económico debido al incremento de los costos de producción de estos cultivos, fundamentalmente por el uso de fungicidas para su control (Pérez *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta los daños que ocasiona el uso de productos químicos, el incremento de la resistencia del hongo a algunos fungicidas (Romero y Sutton, 1997) además de, la complejidad genética de la resistencia en *Musa* spp. a *M. fijiensis* (Craenen y Ortiz, 1996) y las dificultades que se presentan en el mejoramiento genético de los cultivos por su esterilidad y triploidía, resulta necesario encontrar alternativas sostenibles para el manejo de la enfermedad. Para lograr este propósito el estudio a nivel molecular de la interacción, mediante la búsqueda de genes candidatos relacionados con la resistencia, para su utilización en la Ingeniería Genética, sería una opción promisoría.

El desarrollo alcanzado en la biología molecular y sus técnicas, en combinación con el análisis bioinformático y la nueva era en la secuenciación, han contribuido al conocimiento

de la interacción. A pesar de estos esfuerzos aún no se ha realizado una caracterización extensiva de la misma a nivel molecular.

Los estudios a nivel transcriptómico para la obtención de los perfiles de expresión de genes en plantas, relacionados con la patogénesis, constituyen una de las vías utilizadas para la selección de genes candidatos para análisis funcionales (Carpentier *et al.*, 2008).

En la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*, los análisis de expresión de genes se han realizado en cultivares (cv.) con diferentes niveles de resistencia a la enfermedad del rayado negro de la hoja, aunque estos aún resultan limitados. Portal *et al.* (2011) investigaron la respuesta de defensa de plantas susceptibles de *M. acuminata* subgrupo Cavendish cv. ‘Grande naine’ (*Musa* AAA), en un estadio tardío de la infección con *M. fijiensis*, a partir de la creación de una biblioteca de ácido desoxiribonucleico complementario (ADNc) del tipo sustractiva por supresión (SSH, del inglés: *Suppression Subtractive Hybridization*) y otra de cadena completa además de, utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *Polymerase Chain Reaction*) en tiempo real. Por su parte, Passos *et al.* (2012) examinaron las bibliotecas completas creadas en plantas inoculadas con *M. fijiensis* de *M. acuminata* L.A. Colla subsp. *burmannicoides* E.A. del cv. resistente ‘Calcutta 4’ (*Musa* AA) y del cv. ‘Grande naine’ y D’Hont *et al.* (2012) las creadas en los cultivares con genotipo (*Musa* AA) en *M. acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang (‘DH Pahang’) (resistente), ‘Pisang madu’ (parcialmente resistente) y ‘Pisang pipit’ (susceptible) con la técnica de secuenciación de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de alto procesamiento (RNA-Seq, del inglés: *High-Throughput mRNA Sequencing*).

Las investigaciones desarrolladas generaron un recurso transcriptómico valioso para el estudio en *M. acuminata* sin embargo, no se avanzó en el estudio de la expresión de genes

durante la respuesta de cultivares resistentes en un estadio temprano de la infección, lo cual se considera la mejor opción para encontrar genes relacionados con la resistencia a *M. fijiensis*. Los estudios mencionados no profundizaron en este aspecto ya que Portal *et al.* (2011) obtuvieron la expresión tardía de genes en una interacción compatible. D'Hont *et al.* (2012) informaron la activación de genes en diferentes cultivares de *Musa* spp. a los 10 y 16 días posteriores a la inoculación (dpi) y Passos *et al.* (2012) solo determinaron la expresión por Northern blot de los genes *Mt* (*Metalotionina*), *Pox* (*Peroxidasa*) y *Oxo* (*Oxalato oxidasa*) relacionados con la defensa en plantas de 'Calcutta 4' y 'Grande naine' ante *M. fijiensis*.

En general, se necesita mayor información acerca de los genes pertenecientes a rutas metabólicas implicadas en la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos. Se plantea que el desarrollo de plantas resistentes, por medio de la modificación genética, vía transformación de plantas, es una de las estrategias más promisorias para el manejo sostenible de la enfermedad a largo plazo.

Por los motivos anteriormente planteados resulta de gran interés profundizar en el estudio de la interacción *M. acuminata*-*M. fijiensis*, a partir del análisis de la expresión de genes a diferentes dpi, lo cual podría contribuir a un mejor entendimiento de las bases moleculares que definen esta interacción.

El banano 'Calcutta 4' es ampliamente utilizado en los programas de mejoramiento genético como fuente de resistencia a patógenos fúngicos, por su resistencia estable ante *M. fijiensis*. Además, se ha utilizado en el descubrimiento de genes candidatos de resistencia (Azhar y Heslop-Harrison, 2008) y se cree que tiene una respuesta similar a la hipersensible

(Cavalcante *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta el presente esta hipótesis aún no ha sido demostrada a nivel molecular.

Tomando en consideración la importancia de la enfermedad del rayado negro de la hoja, las características del proceso infeccioso y la necesidad de caracterizar a nivel molecular nuevas fuentes de resistencia para su inclusión en los programas de mejoramiento genético del cultivo es que se propone la siguiente hipótesis:

La caracterización molecular de la interacción *M. acuminata*-*M. fijiensis* a partir de la identificación de genes y su expresión en el cultivar resistente ‘Calcutta 4’ en respuesta a la infección, contribuirá a un mejor entendimiento de las bases moleculares de la resistencia al rayado negro de la hoja en banano.

Y para demostrar o refutar la misma se propusieron los siguientes objetivos:

Objetivo general

Caracterizar molecularmente la interacción *M. acuminata*-*M. fijiensis*, para lograr un mejor entendimiento de la resistencia de *Musa* spp. a la enfermedad del rayado negro de la hoja.

Objetivos específicos

- 1.- Identificar ESTs expresadas diferencialmente en plantas de ‘Calcutta 4’ en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*.
- 2.- Establecer los perfiles de expresión de ESTs que se corresponden con genes relacionados con el metabolismo primario, metabolismo secundario y el estrés oxidativo, en plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ frente a la infección con *M. fijiensis*.
- 3.- Determinar mediante PCR en tiempo real los perfiles de expresión de genes relacionados con la síntesis de compuestos fenilpropanoides, en plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ frente a la infección con *M. fijiensis*.

Novedad científica: Se realizó la identificación de genes y rutas metabólicas asociadas con la respuesta de las plantas de ‘Calcutta 4’ ante la infección con este patógeno. Se profundizó en las bases moleculares de la interacción, mediante el análisis de expresión por PCR en tiempo real de ESTs seleccionadas de una biblioteca SSH creada en ‘Calcutta 4’ en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis* y de otras de interés relacionadas con la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides, tanto en la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis* como en la compatible ‘Grande naine’-*M. fijiensis*. A pesar de la complejidad de las rutas metabólicas que intervienen durante una interacción planta-patógeno, los resultados alcanzados con el análisis de ESTs aportaron nuevos elementos que contribuirán con la caracterización molecular del patosistema.

Valor práctico: Se identificaron secuencias de genes relacionados con la resistencia de plantas de ‘Calcutta 4’ a *M. fijiensis*, las cuales estarán disponibles a la comunidad científica internacional, para su utilización en los programas de mejoramiento genético en *Musa* spp.

Valor metodológico: Los estudios desarrollados constituyen un aporte al conocimiento y al entendimiento de la respuesta de *M. acuminata* en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*. Además, se dispondrá de nuevas metodologías para el estudio de la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Musa* spp.

2.1.1. Importancia de los bananos y plátanos

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) se cultivan en más de 100 países en regiones tropicales y subtropicales en un área cercana a los 10 millones de hectáreas y su producción mundial va en ascenso, aproximadamente 140 millones de toneladas en el año 2011 (FAOSTAT, 2011).

2.1.2. Origen y distribución

Los bananos y plátanos son nativos del sudeste asiático y se considera a la península Malaya o a Indonesia, como posible centro de diversidad (Simmonds, 1962), así como de origen primario tanto de *M. balbisiana* como de *M. acuminata*, cuyos cruzamientos dieron origen a todos los cultivares comestibles conocidos en América (Jones, 2000).

La evolución de los cultivares desde las especies silvestres, así como su expansión desde el Sudeste de Asia fue descrita por Simmonds (1962). Los bananos y plátanos fueron introducidos a las Islas Canarias por los portugueses y de ahí pasó al Nuevo Mundo. Se atribuye a Fray Tomás de Berlanga, obispo de Panamá y descubridor de las Islas Galápagos, el traslado de la banana dulce desde las Islas Canarias a Santo Domingo en el año 1516 y de ahí hacia otras regiones como el Caribe y posteriormente al continente americano (Mourichon y Fullerton, 1990).

2.1.3. Taxonomía y diversidad genética

La familia *Musaceae* incluye los géneros *Musa*, *Ensete* y *Musella* y pertenece al orden *Zingiberales*. La primera clasificación del género *Musa* spp. apareció a finales del siglo XIX (Baker, 1893). Cheesman (1947) dividió el género en cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Eumusa* y *Rhodochlamys*, basado en el número de

cromosomas y en las características morfológicas. Más adelante, Argent (1976) propuso incluir una nueva sección llamada *Ingentimusa*, para clasificar las especies de *Musa* con un número de cromosomas diferente.

Las *Musáceas*, son monocotiledóneas con un número cromosómico básico en el género *Musa* spp. (sección *Eumusa*) de $n=11$ y comprende todos los bananos y plátanos comestibles. Estos tuvieron su origen en las especies diploides *M. acuminata* Colla y *M. balbisiana* Colla. La ploidía y el genoma de cada cultivar está representado con A para indicar la procedencia de *M. acuminata* y B de *M. balbisiana* ($2n=2x=22$ respectivamente). De esta forma, las letras A y B permiten la clasificación e identificación de genotipos, en dependencia de la distribución del genoma (D'Hont *et al.*, 2000). Entre los bananos cultivados se encuentran los cv. diploides AA y triploides AAA, mientras que los plátanos son híbridos AAB entre las dos especies ancestrales (Simmonds, 1962). También existen triploides ABB, BBB y tetraploides AAAA, AAAB y AABB (Sandoval y Muller, 1999).

2.1.4. Características del banano silvestre diploide 'Calcutta 4' (*Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*)

Según Pulseglove (1972), los diploides silvestres como 'Calcutta 4' (*M. acuminata* L.A. Colla subsp. *burmannicoides* E.A.) se originaron de la especie *M. acuminata* Colla y tiene su centro de diversidad en el oeste de Malasia.

Esta subespecie se considera una línea pura, cuyas características de desarrollar racimos con frutos pequeños y semillas, no es transmitida a la progenie tetraploide mejorada (Swennen y Vuylsteke, 1993). Además, presenta una resistencia estable ante *M. fijiensis* razón por la cual ha sido empleada en los programas de mejoramiento genético manejados por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) y por el

Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) como fuente de resistencia a patógenos fúngicos de los cuales se generaron híbridos e información valiosa.

El banano ‘Calcutta 4’ también se ha utilizado como modelo en estudios de genómica funcional (Santos *et al.*, 2005) y comparativa (Lescot *et al.*, 2008) y en el descubrimiento de genes candidatos de resistencia (Azhar y Heslop-Harrison, 2008) y se cree que tiene una respuesta similar a la hipersensible (Cavalcante *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012)

2.1.5. Enfermedades en *Musa* spp.

Los bananos y plátanos son susceptibles a un elevado número de plagas y enfermedades. Entre las principales enfermedades que los afectan están: el Mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Snyder y Hanson (Ploetz, 1994), el Virus del cogollo racemoso en bananos (BBTV, del inglés: *Banana Bunchy Top Virus*), el marchitamiento bacteriano producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Ploetz, 2004b) y la enfermedad del moko (*Ralstonia solanacearum*) (Hayward, 2006). Dentro de las plagas está la afectación por nemátodos barrenadores (*Radopholus similis* (Cobb) Thorne) (Marín *et al.*, 2003) y por el picudo negro *Cosmopolites sordidus* Germar (Kiggundu *et al.*, 2003).

Sin embargo, las enfermedades más importantes son las manchas foliares producidas por *Mycosphaerella* spp., entre ellas: *M. musicola* R. Leach (anamorfo: *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton), produce la Sigatoka amarilla; *M. fijiensis* Morelet (anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton), que ocasiona la enfermedad del rayado negro de la hoja y *M. eumusae* (anamorfo: *Pseudocercospora eumusae* (Zimm) Deighton), que produce la mancha foliar *eumusae*. Todas ellas

producen síntomas muy similares en las hojas infectadas, por lo que se les denomina el complejo Sigatoka (Jones, 2003).

2.2. Enfermedad del rayado negro de la hoja en *Musa* spp.

2.2.1. Agente causal

La enfermedad del rayado negro de la hoja es causada por el hongo *M. fijiensis* cuyo ciclo de vida se caracteriza por dos estados: perfecto (teleomorfo) e imperfecto (anamorfo) (Alexopoulos y Mims, 1979).

Teleomorfo: Clase: *Dothideomycete*, Subclase: *Euascoyceta*, Orden: *Capnodiales*, Familia: *Mycosphaerellaceae*, Género: *Mycosphaerella*, Especie: *fijiensis*.

Anamorfo: Clase: *Deuteromycetae*, Subclase: *Hyphomycetae*, Orden: *Hyphomycetales*, Familia: *Dematiaceae*, Género: *Pseudocercospora*, Especie: *fijiensis*.

Estudios citológicos realizados por Lepoivre *et al.* (2003) demostraron que *M. fijiensis* es un patógeno fúngico biotrófico en los primeros estadios, que coloniza los espacios intercelulares sin la formación de haustorios. Una vez que ocurre la penetración del patógeno por los estomas, las hifas crecen entre las células dentro del tejido, el cual se torna necrótico. Posteriormente, el hongo comienza a crecer saprofiticamente en el tejido muerto, clasificándose como hemibiotrófico por su compleja interacción con el hospedante.

2.2.2. Origen y distribución

La enfermedad del rayado negro de la hoja se reconoció como nueva en 1963, en el sureste de Viti Levu a 60 km del Valle de Sigatoka en Fiji, donde la Sigatoka amarilla ya había sido descubierta en 1902 (Rhodes, 1964). Sin embargo, exámenes en especímenes de herbarios indicaron que probablemente estuvo presente en otras áreas de Asia y el Pacífico antes de 1963 (Long, 1979).

Los primeros informes de la presencia de *M. fijiensis* fuera del continente asiático y las Islas del Pacífico se realizaron en Honduras (1972), Costa Rica en 1979, México y a través de América Central en 1980 (Stover, 1980). Posteriormente, se evidenció su presencia en Colombia y Ecuador para el año 1987 (Stover y Simmonds, 1987) y en Cuba en 1990 (Vidal, 1992). En América del Sur, los síntomas fueron primeramente descubiertos en Venezuela, e Islas del Caribe en 1991 (Martínez, 1997), Jamaica y República Dominicana entre 1995-1996 y en Brasil en 1998 (Jones, 2000). En los Estados Unidos se registró en la Florida en 1998 (Ploetz, 1999). En las Islas Galápagos se encontró para el 2002 y a finales de ese año apareció por primera vez en un área de producción comercial cerca de Tully al norte de Queensland (Jacome, 2003). También, se ha encontrado en Las Bahamas (Ploetz, 2004a), Puerto Rico en el 2006 (Irish *et al.*, 2006), San Vicente y las Granadinas y St. Lucia (Anonymous, 2010).

En África se reconoció por primera vez en Zambia en 1973 (Raemaekers, 1975). Después, se expandió rápidamente por África Central y Oriental, Gabón en 1978 (Frossard, 1980), Gambia (1979), Cameroon (1980) y en Nigeria (1986) (Mourichon y Fullerton, 1990). En el este de África la enfermedad fue primeramente identificada en Zanzíbar, Rwanda, Burundi y Tanzania (1987) (Sebasigari y Stover, 1988), siendo su último hallazgo en Madagascar (2000).

2.2.3. Modo de infección y sintomatología

En el hongo *M. fijiensis* las estructuras infectivas (ascosporas y conidios) en la superficie de la hoja, penetran a través de los estomas después de 48 a 72 h con temperaturas superiores a 20°C. Una vez que la hifa penetra ocurre la colonización de las células adyacentes durante los primeros siete días aproximadamente sin evidencia de destrucción de estas. Cuando se establece la infección, una o más hifas vegetativas

emergen desde los estomas ubicados en la parte abaxial de la hoja y se desarrollan a través de la superficie de la hoja paralela a las nervaduras (Stover, 1980).

La enfermedad del rayado negro de la hoja fue descrita por primera vez por Rhodes (1964), pero fueron Meredith y Lawrence (1969) quienes realizaron la descripción detallada de los síntomas. Posteriormente Fouré (1985) los redefinió y propuso seis estadios de desarrollo de la enfermedad acorde con la evolución de estos en plantas adultas cultivadas en condiciones naturales (Tabla 1).

Tabla 1. Estadios de desarrollo de los síntomas de la enfermedad del rayado negro de la hoja en condiciones de campo (Marín *et al.*, 2003).

Meredith y Lawrence (1969)	Fouré (1985)	Descripción
-----	Estado 1a	Marcas despigmentadas (blanquecinas o amarillas) observadas solo por la parte abaxial de la hoja
Estado inicial de pecas	Estado 1b	Pecas rojo parduscas en la parte abaxial de la hoja
Primer estado de rayas	Estado 2	Pecas rojo parduscas en en la parte abaxial y adaxial de la hoja
Segundo estado de rayas	Estado 3	Rayas que cambian de rojizas a pardo oscuras
Primer estado de mancha	Estado 4	Rayas pardo oscuras en la parte abaxial de la hoja y negras en la adaxial
Segundo estado de manchas	Estado 5	Manchas pardo oscuras a negras con halo clorótico
Tercer estado de manchas	Estado 6	Manchas pardo oscuras a negras con centros secos de color gris

Fullerton y Olsen (1995) establecieron una escala para la evaluación de la enfermedad a partir de la inoculación artificial de plantas en casa de cultivo. Estos autores solo reconocieron cinco estadios. Finalmente, esta escala fue redefinida por Alvarado-Capó *et al.* (2003) (Tabla 2).

Tabla 2. Escala descriptiva para la evaluación del desarrollo de los síntomas en hojas de *Musa* spp. inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* en casa de cultivo (Alvarado-Capó *et al.*, 2003).

Estado	Descripción
Estado 0	Hoja sin síntoma
Estado 1	Hojas con pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por la parte abaxial y sin síntoma en la adaxial
Estado 2	Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por la parte abaxial y sin síntoma en la adaxial
Estado 3	Hoja con manchas de contornos regulares o irregulares de coloración pardo-rojiza por la parte adaxial
Estado 4	Hojas con manchas negras (elípticas o circulares) con bordes cloróticos y halo acuoso. La hoja mantiene áreas de tejido verde
Estado 5	Hojas con manchas negras con centros secos grises, las hojas pueden estar completamente necrosadas y colgar del pseudotallo

2.2.4. Epifitiología

En la diseminación de la enfermedad del rayado negro de la hoja tienen un papel fundamental las ascosporas y los conidios de *M. fijiensis*, aunque los conidios se producen en menor cantidad (Burt, 2003). Meredith y Lawrence (1969) observaron que las ascosporas eran producidas en el pseudotecio, en las lesiones maduras de las hojas más viejas o muertas de las plantas, tanto en la parte abaxial como adaxial (Figura 1). Sin embargo, Gauhl *et al.* (2000), encontraron un mayor número de pseudotecios en la parte abaxial de las hojas.

El viento constituye el principal medio de dispersión del hongo desde la fuente de inóculo primarias (hojas infectadas que liberan ascosporas y conidios), hacia las principales regiones productoras de bananos y plátanos (Meredith y Lawrence, 1970).

2.2.5. Medidas de control

Prácticas culturales

Las labores culturales tienen un papel importante en eliminar o reducir las condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad del rayado negro de la hoja. Estas

comprenden el control de malezas, la eliminación de hojas secas, la regulación de la densidad de siembra, un eficiente drenaje en las plantaciones, la quema de hojas e hijuelos infectados y evitar sembrar plantas en áreas húmedas o cerca de áreas con agua permanente. Sin embargo, estas medidas son insuficientes cuando no se complementan con el uso de fungicidas.

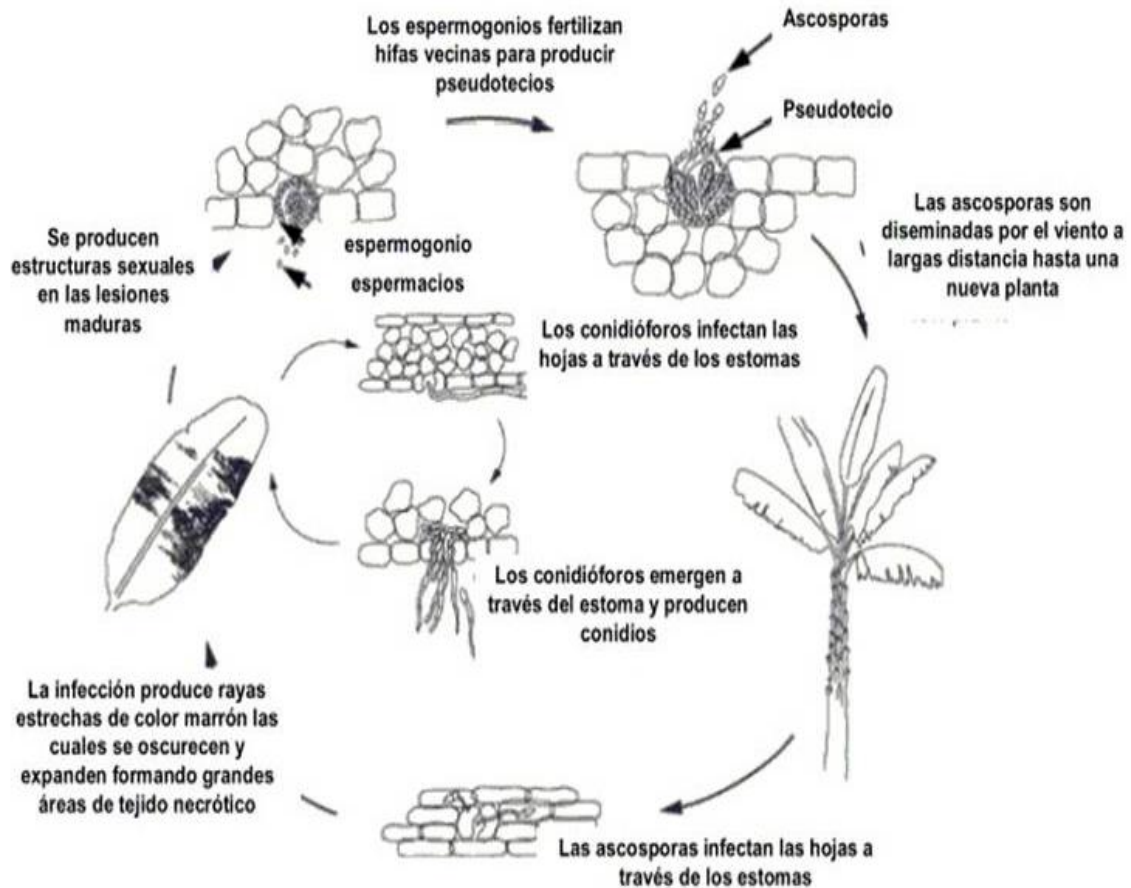


Figura 1. Ciclo infeccioso de *Mycosphaerella fijiensis* en *Musa* spp. (Tomado de Bennett y Arneson (2003)).

Control químico

La enfermedad se controla básicamente por la aplicación frecuente de fungicidas, ya que otras alternativas no han brindado una protección adecuada en el contexto productivo. Se emplean principalmente fungicidas protectores o de contacto

(ditiocarbamatos y clorotalonil) y fungicidas sistémicos (bencimidazoles, triazoles, morfolininas y estrobilurinas), los cuales se alternan y los que tienen diferentes modos de acción se rotan (Marín *et al.*, 2003).

Control biológico

El control biológico de *M. fijiensis* ha recibido poca atención. Sin embargo, la aparición de cepas del hongo resistentes a los fungicidas sistémicos tradicionales, así como la demanda mundial de producciones más limpias, han incentivado los estudios acerca del tema (Marín *et al.*, 2003). Por ser *M. fijiensis* un patógeno foliar y la enfermedad policíclica, la aplicación de esta alternativa resulta dificultosa aunque se han utilizado algunos géneros y especies bacterianas tales como: *Pseudomonas*, *Serratia entomophyla*, *S. marcescens* y *Bacillus cereus* (Riveros *et al.*, 2003). A escala comercial solo existe un producto biológico elaborado a partir de *B. subtilis*, QST 713 (Serenade[®]), producido por AgraQuest Inc., con resultados discretos en el control del patógeno (Edgecomb y Manker, 2005).

Empleo de cultivares resistentes

La utilización de cultivares resistentes se considera una alternativa certera y durable para el control de la enfermedad del rayado negro de la hoja, sin cambiar las técnicas tradicionales de manejo que utilizan los productores. Esto se debe fundamentalmente al elevado costo de los fungicidas, la no disponibilidad de estos para los pequeños agricultores y a los daños que ocasiona su utilización al medioambiente (Marín *et al.*, 2003).

El mejoramiento genético de bananos y plátanos por métodos convencionales está limitado ya que las variedades de mayor interés son estériles, no producen semillas. A pesar de esto, a través de los programas de mejoramiento genético, el IITA obtuvo

diferentes híbridos de plátanos (Ortiz y Vuylsteke, 1994) mientras que la FHIA desarrolló híbridos tetraploides con variación en la respuesta a la enfermedad desde susceptible a moderadamente resistente (FHIA, 2007).

Las dificultades que se afrontan con el mejoramiento genético convencional de estos cultivos pueden ser superadas con el empleo de las técnicas de ingeniería genética. El desarrollo de métodos eficientes de transformación genética para la modificación de las plantas, a través de la transferencia de genes que confieran resistencia a patógenos fúngicos, constituye una posibilidad en el mejoramiento de bananos y plátanos (Roux *et al.*, 2008). A partir de investigaciones realizadas encaminadas en esta dirección, se han obtenido plantas transgénicas de banano que expresan péptidos antimicrobianos (Pérez-Hernández, 2000) y proteínas antifúngicas (Vishnevetsky *et al.*, 2010; Kovács *et al.*, 2012).

2.3. Interacción planta-microorganismo

2.3.1. Elementos de la interacción planta-microorganismo

Las plantas ante el ataque por patógenos han desarrollado mecanismos sofisticados que le permiten percibir estas amenazas e iniciar una respuesta inmune innata eficiente. La defensa constitutiva o pasiva es el primer obstáculo que tiene que evadir un patógeno antes de colonizar el tejido vegetal. Esta incluye barreras preexistentes como la capa de cera cuticular, la rigidez de la pared celular, la presencia de enzimas antimicrobianas y de metabolitos secundarios que actúan como barreras para su entrada y propagación (Agrios, 2005).

Para la resistencia a enfermedades en plantas se plantea la teoría “un gen para un gen” descrita por Flor (1971) durante el estudio de la herencia de la patogenicidad del hongo *Melampsora lini* en variedades de *Linum usitatissimum*. Esta sugirió que para cada gen que condiciona la respuesta en el hospedante (gen de resistencia) (R), existe un gen

correspondiente en el patógeno que condiciona la patogenicidad (gen de avirulencia) (Avr). A partir de las evidencias moleculares obtenidas del estudio de la teoría “un gen para un gen” se incrementó el entendimiento de la hipótesis y se aceptó que las plantas contienen dos líneas de defensa.

En la primera línea defensiva, si el patógeno logra vencer las barreras preformadas existentes entonces puede ser detectado por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés: *Pattern Recognition Receptors*) en la membrana y se inicia la inmunidad activada por patrones moleculares asociados al patógeno o al microorganismo (PTI, del inglés: *PAMP-Triggered Immunity*), (PAMPs, del inglés: *Pathogen Associated Molecular Patterns* o MAMPs, del inglés: *Microbe Associated Molecular Patterns*) (Jones y Dangl, 2006). La respuesta inmune innata activada por PAMP atenúa el crecimiento del patógeno y contribuye con la defensa basal. Esta es iniciada por moléculas como la flagelina bacteriana, la cual es reconocida por el receptor sensible a flagelina 2 similar a kinasa (FLS2, del inglés: *Flagellin Sensitive 2 Receptor-like Kinase*) (Boller y Felix, 2009) y también por quitina y β -glucanos. Diferentes respuestas intracelulares están asociadas con PTI e incluyen el flujo de iones a través de la membrana plasmática, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*), cambios en la expresión de genes y reforzamiento de la pared celular entre otras (Jones y Dangl, 2006).

Una vez que el sistema de defensa basal es vencido por patógenos, se produce un reconocimiento más especializado basado en la percepción de los efectores por proteínas de resistencia R y la subsecuente inducción de la inmunidad activada por efectores (ETI, del inglés: *Effector Triggered Immunity*), denominada respuesta hipersensible (HR), la cual es una respuesta rápida y resulta en muerte celular localizada del patógeno alrededor del sitio de infección (Jones y Dangl, 2006).

En plantas se han identificado un gran número de proteínas R, las cuales tras el reconocimiento del efector se ubican principalmente dentro de cinco clases. La mayoría comprende proteínas con sitio de unión a nucleótido (NBS, del inglés: *Nucleotide Binding Site*) más repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés: *Leucine-Rich Repeats*). Las proteínas R representan una clase de receptores inmune capaz de detectar directamente o indirectamente efectores específicos del patógeno codificados por los genes Avr. Algunas proteínas R son receptores tipo kinasa (RLK del inglés: *Receptor-Like Kinase*) y receptores tipo proteína (RLP del inglés: *Receptor-Like Protein*) (Martin *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta esta premisa, en el género *Musa* spp. se ha realizado la búsqueda de posibles miembros de genes R, principalmente de genes de resistencia análogos (RGAs, del inglés: *Resistance Gene Analogs*) (Azhar y Heslop-Harrison, 2008). En este sentido, Miller *et al.* (2008) en plantas resistentes de 'Calcutta 4' realizaron por primera vez el análisis a gran escala de NBS-LRR RGAs y Emediato *et al.* (2009) de la caracterización de RGAs por PCR de los cultivares con genotipo (*Musa* AA) 'Calcutta 4' y 'Pisang Berlin' (susceptible), encontraron 63 secuencias con homología a RGAs.

En el caso de los efectores algunos no son especie específica como Avr4 y la proteína extracelular Ecp2 (Ecp, del inglés: *Extracellular proteins*), lo cual fue informado por Stergiopoulos *et al.* (2010). Ambos son homólogos funcionales en el patógeno de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Cladosporium fulvum* Cooke y en *M. fijiensis*. La proteína Avr4 de *M. fijiensis* pudiera unir quitina y actuar como un factor de virulencia que protege la pared fúngica de la hidrólisis por quitinasas. Además, es capaz de activar HR en tomate mediada por Cf-4. Por su parte, de los tres Ecp2 homólogos encontrados en *M. fijiensis* uno induce diferentes niveles de necrosis al interactuar con

el posible blanco en el hospedante. Se plantea que la proteína *Cf-Ecp2* posiblemente vigile el blanco de virulencia de *Ecp2* y activa HR mediada por *Cf-Ecp2*.

2.3.2. Importancia del estudio molecular de efectores y proteínas R

El conocimiento de los genes involucrados en procesos claves en la infección de la planta como el gen *Avr* y el gen *R*, son de gran interés como blancos potenciales para el desarrollo de estrategias de manejo sostenible de enfermedades. Aunque en algunos casos la interacción R-efector determina el éxito del patógeno o su fallo, la relación hospedante-patógeno es mucho más compleja e involucra numerosos genes de ambas partes (Jones y Dangl, 2006).

En el patosistema *Musa* spp.-*M. fijiensis*, el estudio de la interacción R-efector para la identificación de efectores con mayor contribución a la virulencia, podría permitir la identificación de genes *R*. Además, el conocimiento de los sitios blancos en el hospedante frecuentemente atacados por los efectores, permitiría ubicar estos sitios y sus proteínas *R* guardianes.

2.3.3. Resistencia inducida

La respuesta inducida se produce a partir del reconocimiento inicial del patógeno por la planta y una vez que el patógeno ha superado las estructuras de defensa preformadas, se inducen diferentes mecanismos de respuesta. Entre ellos la lignificación, la formación de capas de corcho, sustancias gomosas, calosa e incremento de las proteínas de pared con glicoproteínas ricas en prolina e hidroxiprolina. De conjunto con las estructuras desarrolladas para bloquear o limitar la extensión del patógeno, se acumulan compuestos tipo fitoalexinas (fenoles, terpenoides, poliacetilenos y derivados de ácidos grasos). Además, se produce la respuesta hipersensible asociada con el de flujo de iones, generación de ROS y la activación de la cascada de fosforilación de proteínas,

creándose así un ambiente fisiológico que impide el crecimiento e invasión del patógeno (Agrios, 2005).

Respuesta hipersensible

La respuesta hipersensible es una forma de muerte celular programada, que aparece en interacciones incompatibles, asociada con la resistencia de la planta a la infección por patógenos biotróficos y hemibiotróficos, los cuales durante su ciclo infeccioso se nutren de las células vivas de la planta. En las células infectadas, así como en las que las rodean, se produce el reforzamiento de la pared celular por la deposición de compuestos fenólicos, síntesis de fitoalexinas y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-proteins, del inglés: *Pathogenesis Related Proteins*). Además, se generan flujos iónicos y de protones a través de la membrana en el citoplasma y ROS. Como resultado de tan intensa actividad celular ocurre una muerte rápida y localizada del tejido alrededor del sitio de infección, lo que limita la multiplicación y expansión del patógeno (Shetty *et al.*, 2008).

Especies reactivas de oxígeno

La generación y acumulación de ROS coincide con la inducción de la muerte celular asociada con la respuesta hipersensible. La producción de ROS incluye radicales libres como: el superóxido ($O_2^{\cdot-}$), en equilibrio con su forma protonada el hidroperoxil (HO_2^{\cdot}), el hidroxilo (OH^{\cdot}) y no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno (O_2). La inducción de ROS constituye la primera respuesta detectable en el sitio de la infección en un lapso de minutos y se sugiere que estimula la cascada de defensa en varias especies de plantas (Torres, 2010).

La acumulación de ROS inducida bajo condiciones de estrés en la célula puede inactivar enzimas y dañar componentes celulares importantes, por lo que su producción se

contrarresta a través de la acción de varios sistemas antioxidantes. Entre ellos se encuentran los enzimáticos como: SOD (Superóxido dismutasa), APX (Ascorbato peroxidasa), CAT (Catalasa), POX y TRX (Tioeredoxina). Además, metabolitos de bajo peso molecular no-enzimáticos como: las MT (Wong *et al.*, 2004), el ácido ascórbico, el α -tocoferol, glutatión, carotenoides y flavonoides (Torres, 2010).

Entre los sistemas antioxidantes enzimáticos, las peroxidases se utilizan frecuentemente como indicador del estrés oxidativo. Estas proteínas pertenecen al grupo de las hemoproteínas y están involucradas en la elongación celular a través de las peroxidases unidas a la pared celular, en el proceso de lignificación, síntesis de fitoalexinas y en el metabolismo de ROS durante la respuesta de defensa (Almagro *et al.*, 2008). En plantas de 'Calcutta 4' la presencia de actividad POX en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis* ha sido relacionada con la respuesta similar a la hipersensible (Cavalcante *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012).

Otros sistemas enzimáticos como CAT (en peroxisoma y mitocondria) y APX (en cloroplasto, citosol, mitocondria y peroxisoma) (Shigeoka *et al.*, 2002), se consideran las enzimas principales que metabolizan el H_2O_2 producido por la dismutación del radical $O_2^{\cdot-}$. Shetty *et al.* (2007) destacaron que la presencia de actividad CAT estaba involucrada en la resistencia de plantas de *Triticum aestivum* L. a *M. graminicola* (Fuckel) J. Schröt in Cohn. Kottapalli *et al.* (2007) plantearon que durante la respuesta incompatible de arroz ante *X. oryzae* pv. *oryzae* los sistemas antioxidantes APX y CAT se inhiben, para contribuir con la defensa de la planta a través del aumento de los niveles de ROS.

Por otra parte, las TRX (pequeñas oxidoreductasas capaces de reducir puentes disulfuro de numerosas proteínas), también reducen el H_2O_2 y protegen la célula del estrés oxidativo (Peterson *et al.*, 2005). Además, están involucradas en la regulación de la

expresión de genes, transducción de señales y proliferación celular (Rivas y Thomas, 2005). Su papel en la resistencia a enfermedades fue observado por Rivas *et al.* (2004) en la infección del tomate con *C. fulvum* y por Laloï *et al.* (2004) en la respuesta de defensa de *A. thaliana* a *P. syringae* pv. *tomato* y al estrés oxidativo.

Las MT son polipéptidos de bajo peso molecular ricos en residuos de cisteína, encargados de mantener el equilibrio de metales intracelulares, regular el potencial redox intracelular y de proteger la célula de daños oxidativos por medio de la eliminación de los radicales OH[•] (Hassinen *et al.*, 2011). La activación de varias isoformas del gen *Mt* en arroz (*Oryza sativa* L.) fue evidenciada ante el ataque por *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr (Campo *et al.*, 2008), al igual que en la respuesta de plantas de *Vitis vinifera* L. a la infección con *Plasmopara viticola* (Berl. y Curt) (Legay *et al.*, 2011).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados a partir de intermediarios del metabolismo primario, a través de rutas como la de los fenilpropanoides. Sus funciones varían desde compuestos con actividad antimicrobiana (fitoanticipinas y fitoalexinas), hasta moléculas señales involucradas en la señalización local y sistémica para la inducción de genes de defensa. Además, forman parte del arsenal defensivo de la planta y sus funciones no se restringen a un compuesto en particular (Dixon *et al.*, 2002).

En el género *Musa* spp. la inducción de compuestos derivados de la ruta de los fenilpropanoides (fitoalexinas) tales como las fenilfenalenonas, se identificaron en bananos y plátanos y su concentración se correlacionó con la resistencia a *M. fijiensis* (Otálvaro *et al.*, 2002a). Además, dos nuevos compuestos del tipo fenalenonas

(Otálvaro *et al.*, 2007) y dos perinaftenonas naturales aisladas del cv. resistente ‘Yangambi km 5’ (*Musa* AAA) (subgrupo Ibota) (Hidalgo *et al.*, 2009), mostraron actividad antifúngica *in vitro* contra *M. fijiensis*. Recientemente, Echeverri *et al.* (2012) propusieron la utilización de las fenilfenalenonas como un posible tipo de fungicida para el control de la enfermedad del rayado negro de la hoja, lo cual podría considerarse una posible estrategia de defensa en el género.

2.4. Interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*

En la interacción entre *Musa* spp. y *M. fijiensis* se conocen diferentes niveles de respuesta del hospedante a la enfermedad del rayado negro los cuales se han definido en tres categorías: altamente resistente (interacción incompatible), parcialmente resistente y susceptible (interacción compatible) (Ortiz y Vuylsteke, 1994).

2.4.1. Tipos de interacción

En la interacción compatible ocurre el desarrollo completo del ciclo infeccioso de *M. fijiensis* y se pueden observar fenotipos con extrema susceptibilidad y con resistencia parcial a la enfermedad del rayado negro de la hoja. Cuando el clima es favorable, el hongo se desarrolla rápidamente y la tasa de esporulación por lesiones es elevada (Abadie *et al.*, 2003). En condiciones de campo al momento de la cosecha en los bananos susceptibles, puede no observarse hojas funcionales debido a su necrosis total.

La interacción incompatible se caracteriza por el bloqueo del desarrollo de los síntomas de la enfermedad y la ausencia de esporulación (sexual o asexual). En ella se incluyen bananos con alto nivel de resistencia comparable a la descrita para ‘Yangambi km 5’ y ‘Calcutta 4’. Este fenotipo es muy similar a la respuesta de hipersensibilidad observada en otras interacciones planta-patógeno (Hoss *et al.*, 2000).

2.4.2. Genética de la resistencia propuesto para cultivares resistentes en *Musa* spp.

Ortiz y Vuylsteke (1994) propusieron un modelo genético donde existe un alelo de resistencia recesivo principal (bs_1) y dos alelos independientes con efecto aditivo (bsr_2 y bsr_3), los cuales aumentan la resistencia a la enfermedad del rayado negro de la hoja. Estos alelos provienen principalmente del banano 'Calcutta 4'. Según Craenen y Ortiz (1997) la acción aditiva del gen bs_1 constituía un factor importante en la respuesta de defensa de la planta ante el patógeno y su acción podría proveer una protección duradera a la enfermedad. Además, plantearon que la resistencia en plantas de 'Calcutta 4' a esta enfermedad podía tener base poligénica.

2.4.3. Herramientas moleculares y bioinformáticas en el estudio del género *Musa* spp.

Teniendo en cuenta la importancia global del cultivo de bananos y plátanos y la creciente demanda de nuevas fuentes de resistencia ante las plagas y enfermedades que los afectan, la aplicación de las herramientas de biología molecular ofrecen grandes expectativas en el mejoramiento genético en *Musa* spp., principalmente en la búsqueda de posibles genes de interés agronómico.

El desarrollo alcanzado en la biología molecular y sus técnicas, en combinación con el análisis bioinformático (procedimientos, métodos y sistemas de análisis de información) y los nuevos métodos de secuenciación a gran escala para el procesamiento de gran cantidad de muestras, han contribuido con el estudio del género *Musa* spp. tanto a nivel de genoma como de la interacción con *M. fijiensis*.

El genoma de *Musa* spp. se ha estudiado fundamentalmente a través de la creación de bibliotecas genómicas, como las realizadas con el empleo de un cromosoma bacteriano artificial (BAC, del inglés: *Bacterial Artificial Chromosome*) en *M. acuminata* L. A.

Colla subsp. *burmannicoides* E.A. ‘Calcutta 4’ (Vilarinhos *et al.*, 2003) y por Šafár *et al.* (2004) en *M. balbisiana* ‘Pisang Klutuk Wulung’ (*Musa* BB) . Además, la creada en *M. acuminata* ‘Tuu Gia’ (*Musa* AA) con la utilización de un cromosoma bacteriano artificial binario (BIBAC, del inglés: *Competent Binary Bacterial Artificial Chromosome*) (Ortiz-Vázquez *et al.*, 2005). Otras bibliotecas de esta índole fueron realizadas en plantas de ‘Calcutta 4’ (C4BAM) y de ‘Grande naine’ (MAC), las cuales no fueron publicadas (Roux *et al.*, 2008).

Los estudios moleculares en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis* aun son limitados. Se conoce que la relación de las plantas con los microorganismos es un fenómeno complejo que involucra un gran número de moléculas que señalizan su reconocimiento y la posterior inducción de la respuesta de defensa en el hospedante (Jones y Dangl, 2006). A este entendimiento, el estudio de transcriptomas ha contribuido en gran medida ya que permite interpretar los elementos funcionales del genoma, conocer los componentes moleculares de células y tejidos además de comprender el desarrollo de la planta y sus enfermedades. Dentro de los análisis transcriptómicos, la identificación de los perfiles de expresión de genes en plantas ante la infección por patógenos tienen gran prioridad y se considera uno de los parámetros utilizados en la selección de genes candidatos para la realización de análisis funcionales (Whisson *et al.*, 2007).

Los ensayos de expresión en el género *Musa* spp. frente a la infección con *M. fijiensis*, se han realizado preferentemente a partir de la creación de bibliotecas de ADNc. Entre ellas la biblioteca SSH tiene la ventaja de ser simple y eficiente en generar fragmentos de ADNc altamente enriquecidos para genes expresados diferencialmente de alta y baja abundancia (Diatchenko *et al.*, 1996). También se han utilizado las bibliotecas de cadena completa, con las cuales se obtiene una mayor representación del transcriptoma y transcritos de mayor longitud. Estas técnicas se han utilizado individualmente o de

conjunto con otras como el PCR en tiempo real y el RNA-Seq, métodos basados en la hibridación y la secuenciación respectivamente, en el estudio del patosistema.

El PCR en tiempo real, se ha convertido en una herramienta muy valiosa dentro de la genómica funcional para los estudios de expresión de genes. Su efectividad en la amplificación y exactitud en la cuantificación de los niveles de ácidos nucleicos, ha conllevado a la aparición de múltiples aplicaciones.

En la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis* se han realizado varios estudios de expresión. A partir de la inoculación artificial de plantas de ‘Grande naine’ con una suspensión micelial de *M. fijiensis* Portal *et al.* (2011) analizaron una biblioteca SSH y otra de cadena completa creadas en un estadio tardío de la infección con este patógeno. Además, emplearon el PCR en tiempo real para el análisis de algunos genes de interés. Por otra parte, D’Hont *et al.* (2012) utilizaron el RNA-Seq para el análisis de varias bibliotecas de cadena completa realizadas en el genotipo (*Musa* AA): (‘DH-Pahang’), ‘Pisang madu’ y ‘Pisang pipit’ a la enfermedad del rayado negro de la hoja, creadas de una mezcla de discos de hojas inoculados (10 y 16 dpi) bajo condiciones controladas tomados de plantas *in vitro*. Finalmente, Passos *et al.* (2012) con la creación de las bibliotecas de cadena completa en las interacciones ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis* y ‘Grande naine’-*M. fijiensis*, a partir de discos de hojas tomados de plantas mantenidas en casa de cultivo e inoculados posteriormente, hicieron una gran contribución de ESTs para las bases de datos públicas. Además, obtuvieron los perfiles de expresión por Northern blot para los genes *Mt*, *Pox* y *Oxo* relacionados con la defensa en estos cultivares.

Es de destacar que a pesar de los resultados obtenidos con los análisis transcriptómicos realizados en la interacción, no se cuenta con suficiente información acerca de la expresión de genes en plantas en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*.

Aún cuando los proyectos de secuenciación de genomas avanzan rápidamente, el empleo de la bioinformática de conjunto con el análisis de ESTs (secuencias pequeñas que representan solo fragmentos de genes), son fundamentales en la investigación primaria para el descubrimiento de genes. Ambas permiten la identificación y categorización de secuencias, en una amplia variedad de especies, lo que se considera un importante recurso para la anotación de secuencias genómicas. La bioinformática es una de las áreas de investigación de mayor dinamismo y dentro de ella el análisis de ESTs, la de mayor crecimiento en las bases de datos públicas (Wolfsberg, 2001).

El estudio de los patosistemas a partir de la realización de bibliotecas ESTs se ha facilitado con la aplicación de estos recursos bioinformáticos. Entre ellos el ensamblaje de secuencias para disminuir la redundancia resultante de las bibliotecas creadas (Huang y Madan, 1999) y la comparación de pares de secuencias para encontrar el mejor alineamiento local o global de la secuencia nucleotídica o aminoacídica (*Blast*) (Altschul *et al.*, 1997), con respecto a las secuencias anotadas en base de datos (proceso de marcar los genes y otros datos en una secuencia de ácido desoxiribonucleico (ADN)).

2.5. Avances en el mejoramiento genético de *Musa* spp. relacionado con la enfermedad del rayado negro de la hoja

Teniendo en consideración la importancia global de los bananos y plátanos, el aumento de las plagas y enfermedades que los afectan y las limitantes que se presentan con el mejoramiento genético convencional por el largo ciclo de vida, poliploidía y esterilidad de los cultivares comestibles (Vuylsteke *et al.*, 1993), existe una demanda creciente de nuevas fuentes de resistencia.

En *Musa* spp. se han alcanzado progresos significativos con el empleo de la ingeniería genética para el desarrollo de diferentes protocolos de transformación. Entre ellos, la

electroporación de protoplastos (Sagi *et al.*, 1994), bombardeo de suspensiones celulares con partículas (Becker *et al.*, 2000) y la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esta última se considera eficiente y provee altos niveles de expresión del transgen (Pérez-Hernández *et al.*, 2006).

Existe un creciente interés en el mejoramiento genético de bananos mediante la transformación para aumentar la resistencia a enfermedades fúngicas. Sreeramanan *et al.* (2006) transformaron yemas meristemáticas de plantas *in vitro* de 'Pisang Rastali' (*Musa* AAB) con una quitinasa de arroz y una β -1,3 endoglucanasa de *G. max* y encontraron un aumento de las actividades de estas enzimas en las plantas transformadas con respecto al control no transformado. Por otra parte, la transformación del banano 'Gros Michel' (*Musa* AAA) con dos quitinasas de arroz mostró la capacidad de estos genes para incrementar la resistencia a *M. fijiensis* (Kovács *et al.*, 2012). Es de destacar, que a pesar de los esfuerzos realizados en esta temática aún no se cuenta con ningún cultivar comercial con resistencia a la enfermedad.

El desarrollo alcanzado en las técnicas de la biología molecular, ingeniería genética y en las herramientas bioinformáticas, han favorecido el estudio del género *Musa* spp. así como, de la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis*, para la búsqueda de genes de interés relacionados con la resistencia a la enfermedad del rayado negro de la hoja. Avances en el descubrimiento y entendimiento de rutas bioquímicas involucradas en la respuesta defensiva de bananos ante este patógeno, se han derivado del análisis de diferentes bibliotecas ESTs de conjunto con otras técnicas de expresión de genes. Sin embargo, el conocimiento existente acerca de posibles genes implicados en la resistencia de plantas a *M. fijiensis* es aún limitado.

Por estos motivos, identificar genes expresados diferencialmente de una biblioteca SSH creada en plantas de 'Calcutta 4' en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*

asi como, obtener los perfiles de expresión para ESTs seleccionadas de esta biblioteca y de otras relacionadas con la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides, tanto en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* como en la compatible 'Grande naine'- *M. fijiensis*, constituye una alternativa en la búsqueda de posibles genes de resistencia a la enfermedad del rayado negro de la hoja. Los resultados de esta investigación podrían contribuir con el diseño de futuras estrategias, para poder avanzar de forma más rápida en los programas de mejoramiento genético en *Musa* spp.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del sistema hospedante-patógeno

Se empleó el protocolo propuesto por Leiva-Mora *et al.* (2010). La cepa de *M. fijiensis* CCIBP-Pf-83 utilizada en este trabajo se obtuvo a partir de un aislado monoascospórico de una hoja del cv. ‘Grande naine’, con síntomas de la enfermedad del rayado negro de la hoja. Esta fue caracterizada sobre la base de su agresividad, caracteres culturales y morfológicos (Cruz *et al.*, 2004) y pertenece a la colección de Cultivos Microbianos del Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Cuba.

Fragmentos de micelio de *M. fijiensis* obtenidos a partir de tubos de ensayo con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA, del inglés: *Potato dextrose agar*) (DIFCO, Alemania), fueron inoculados en frascos Erlenmeyer con 100 mL de medio de cultivo caldo papa dextrosa (PDB, del inglés: *Potato dextrose broth*) (DIFCO, Alemania). Los Erlenmeyers se colocaron en un agitador orbital (Thermoshaker, Alemania) a 120 rpm durante 14 días a 28°C para el crecimiento del hongo. Transcurrido ese período de tiempo, se eliminó el medio de cultivo por decantación y se tomó 1 g del micelio para la inoculación de las plantas y el resto se liofilizó a -50°C con una presión de vacío de 1,5 mbar durante 24 h en un liofilizador (Modelo ALPHA 1-2 LD plus, Martin Christ, Alemania), previo a la purificación de ácido ribonucleico (ARN), el cual se conservó a 4°C.

La suspensión micelial se preparó por ruptura del micelio en 30 mL de agua destilada estéril con un homogenizador Ultra Turrax T25 (Rose Scientific Ltd., Canadá) durante 1 min. Posteriormente, se filtró utilizando filtros de 40 µm y se determinó la concentración de la suspensión micelial por observación al microscopio óptico

(Olympus, Japón) (100x), en una cámara de Neubauer. La concentración se ajustó hasta aproximadamente 1×10^5 fragmentos de micelio mL^{-1} .

Como material vegetal se utilizaron plantas de banano de 'Calcutta 4' (sección *Eumusa* con número de acceso ITC0249), el cual fue declarado por la Red Internacional para el Mejoramiento de Bananos y Plátanos (INIBAP), actualmente Bioversity International, como resistente a la enfermedad del rayado negro de la hoja (Carlier *et al.*, 2003). Además, se emplearon plantas de 'Grande naine' obtenidas de la colección de germoplasma *in vitro* del IBP.

Las plantas se propagaron *in vitro* según el protocolo utilizado por el INIBAP (Strosse *et al.*, 2004) y después de ocho subcultivos de multiplicación se enraizaron, aclimatizaron en la casa de cultivo en un sustrato compuesto por humus de lombriz 50%, compost 30% y zeolita 20%. Para su crecimiento se mantuvieron bajo un fotoperíodo de 12 h de luz/12 h oscuridad, con una temperatura media durante el día de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de $80 \pm 5\%$. El riego se realizó por microaspersión dos veces al día por 2 min. Una vez que las plantas alcanzaron una altura mínima de 20 cm y tres hojas activas, se colocaron en la casa de cultivo con luz solar con una media en la intensidad luminosa de $3\ 841 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ medida con un luxómetro (Extech Light Meter 401025, EE.UU.) para su posterior inoculación.

La inoculación artificial de las plantas en la casa de cultivo se realizó por la parte abaxial de la hoja (tres primeras hojas abiertas por cada planta) con una suspensión de aproximadamente 1×10^5 fragmentos de micelio mL^{-1} , según el protocolo descrito por Alvarado-Capó *et al.* (2003) (Figura 2).

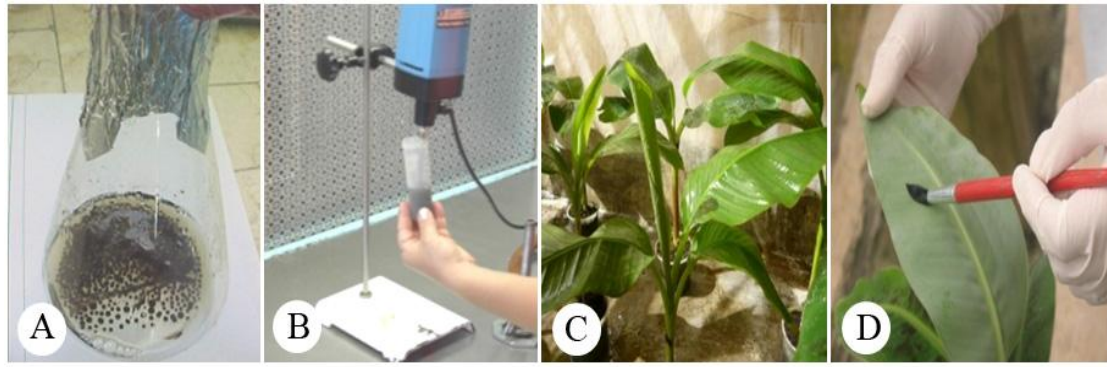


Figura 2. Inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con una suspensión micelial de *Mycosphaerella fijiensis* en casa de cultivo. A) cultivo de *M. fijiensis* en caldo papa dextrosa, B) preparación de una suspensión micelial de *M. fijiensis*, C) plantas de 'Calcutta 4' y 'Grande naine' obtenidas a partir del cultivo *in vitro*, D) inoculación de plantas por la parte abaxial de las hojas.

Para la construcción de una biblioteca SSH, se utilizaron 14 plantas de 'Calcutta 4'. De ellas se inocularon artificialmente seis plantas y el resto se emplearon como controles para cada punto de análisis (dos réplicas biológicas).

Con el objetivo de realizar diferentes análisis bioquímicos y moleculares se procedió con la inoculación artificial de 18 plantas de 'Calcutta 4' así como, de 'Grande naine'. El experimento contó además con plantas no inoculadas de ambos cultivares. Se utilizaron tres réplicas biológicas por cada punto de análisis de la interacción.

Después de inoculadas las plantas la temperatura en el local se mantuvo alrededor de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, la humedad relativa cercana al 100% por tres días y a partir de ese momento entre 60 y 70%. La ubicación de las plantas fue completamente al azar.

3.1. Identificación de transcritos de genes expresados en plantas de 'Calcutta 4' en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*

3.1.1. Construcción de una biblioteca SSH

El protocolo de hibridación sustractiva por supresión fue utilizado para generar una biblioteca SSH en plantas de 'Calcutta 4', en una etapa temprana de la infección con *M. fijiensis* como se muestra en la Figura 3.

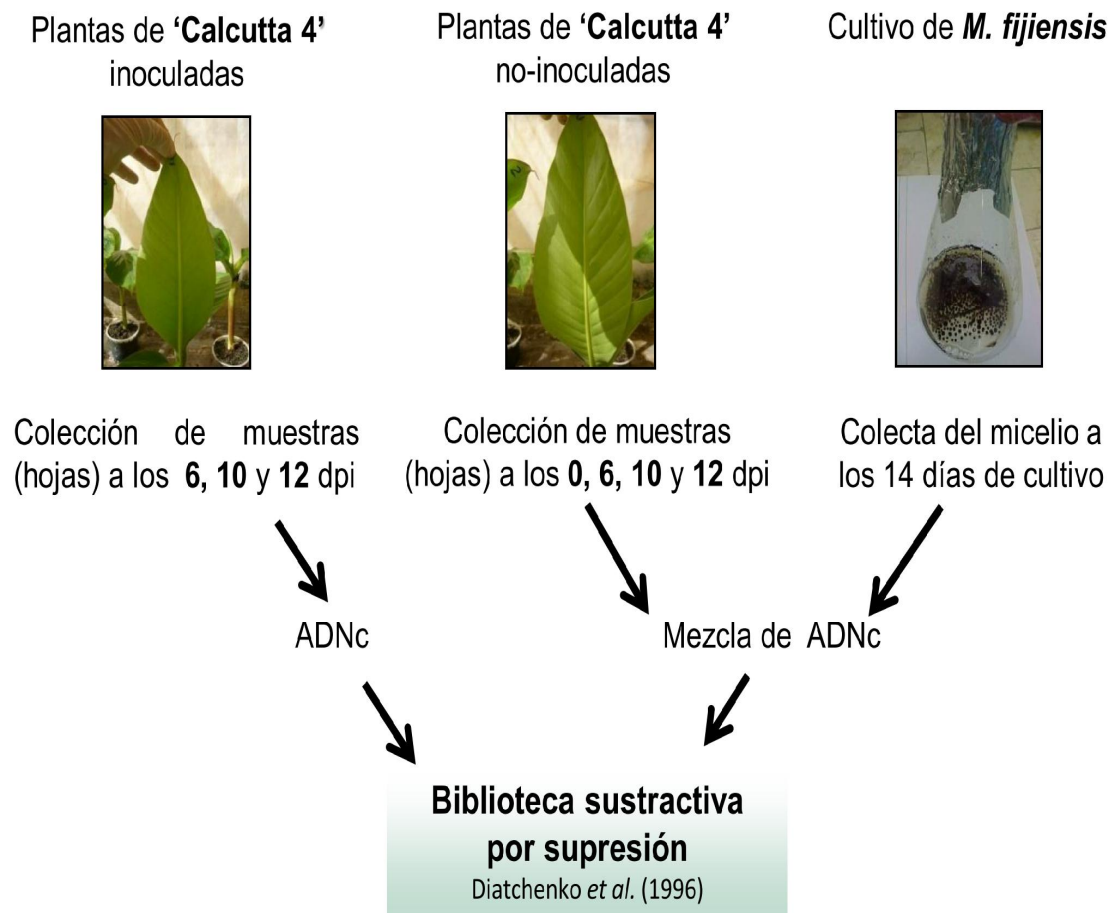


Figura 3. Diseño experimental realizado para la obtención de una biblioteca sustractiva en el cultivar resistente 'Calcutta 4', en respuesta a la infección con *Mycosphaerella fijiensis*.

Toma de muestras

De la inoculación artificial de plantas realizada para la construcción de una biblioteca SSH, descrita en el acápite 3, se tomaron muestras (de las hojas dos y tres) de dos plantas de 'Calcutta 4' inoculadas con *M. fijiensis* para cada punto de análisis (6, 10 y 12 dpi). Las muestras de plantas no inoculadas se recolectaron al inicio del experimento y en igual período de tiempo. Las hojas cortadas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se maceraron hasta obtener un polvo fino con ayuda de mortero y pistilo preenfriados. Finalmente, el tejido se conservó a -80°C hasta su utilización.

Purificación de ARN

Las purificaciones de ARN total se realizaron a partir de 1 g de tejido foliar macerado congelado (se mezclaron 0,5 g de las muestras de hojas dos y tres) de cada planta, basado en el protocolo descrito por Liao *et al.* (2004) (Anexo 1). El ARN del hongo se purificó de 1 g de micelio liofilizado crecido por 14 días en medio de cultivo PDB, según el protocolo descrito por Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008) (Anexo 2).

Las purificaciones de ARNm de las plantas y del hongo se realizaron con el sistema comercial *Oligotex® mRNA* (Qiagen, Alemania), a partir de 10 µg de ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En cada caso, la calidad del ARN (1 µL) se verificó por medición en un espectrofotómetro *BioPhotometer* (Eppendorf, Alemania) y su integridad se comprobó por electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) en tampón TBE 1X (Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 2 mM), el cual fue teñido con bromuro de etidio (BrEt) 0,5 µg mL⁻¹.

Biblioteca SSH

La preparación de la biblioteca SSH se llevó a cabo con el sistema comercial *PCR-Select™ cDNA Subtraction* (BD Biosciences Clontech, Alemania), de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

La hibridación sustractiva por supresión se realizó acorde con el protocolo descrito por Diatchenko *et al.* (1996). Para ello se tomó una población de ADNc obtenida a partir de 2 µg de ARN mensajero de plantas de ‘Calcutta 4’ inoculadas con *M. fijiensis* (la cantidad total fue una mezcla de los ARNm purificados a los diferentes intervalos de tiempo) y una mezcla sustractora que consistió de ADNc sintetizado de 1 µg de ARN mensajero de plantas no inoculadas y de 1 µg de ARN del micelio del hongo liofilizado. Los ADNc de la muestra de interés y de la mezcla sustractora fueron digeridos

enzimáticamente con la enzima *RsaI* (Fermentas, Alemania) para generar fragmentos con terminales romos. La muestra de interés fue dividida en dos y cada una fue ligada a un adaptador diferente. Posteriormente, se hibridaron por separado con un exceso de la mezcla sustractora, para permitir el enriquecimiento de secuencias expresadas diferencialmente. Durante la segunda hibridación, las dos muestras de la hibridación primaria se mezclaron para formar nuevos híbridos de doble cadena con extremos diferentes y se añadió nueva mezcla sustractora desnaturalizada. Aquellos fragmentos presentes en la muestra de interés y ausentes en la sustractora se amplificaron específicamente mediante PCR. El PCR primario contó de 32 ciclos y el secundario de 17 y se hizo con cebadores que hibridaban con los adaptadores en los extremos 3' y 5'. Las amplificaciones se efectuaron en un equipo *Mastercycler® personal* (Eppendorf, Alemania) y los productos de la sustracción se separaron en gel de agarosa 2% (m/v) en tampón TBE 1X, el cual fue teñido con BrEt 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La biblioteca SSH se confeccionó mediante la clonación del producto de la hibridación sustractiva, enriquecida para las secuencias expresadas diferencialmente, en el vector plasmídico pTZ57R/TDNA, del sistema comercial *InsT/Aclone™ PCR Product Cloning* (Fermentas, Alemania). Posteriormente, la ligazón se transformó en células competentes de *Escherichia coli* XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(rk-, mk+), supE44, relA1, lac, [F', proAB+, lacI^qZΔM 15, ::Tn10(Tet^r)], con el sistema comercial *Transform Aid™ Bacterial Transformation* (Fermentas, Alemania), con selección de colonias blancas y azules. Las colonias recombinantes se seleccionaron en medio de cultivo agar Luria Bertani (Triptona 10 g L⁻¹, extracto de levadura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹, agar 15 g L⁻¹), que contenía isopropil-β-D-thiogalactopiranosido (0,1 mM), 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactósido (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y ampicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para

la generación de la biblioteca SSH, se seleccionaron las colonias blancas. Un total de 600 clones se tomaron de la biblioteca y se conservaron en gliceroles.

3.1.2. Secuenciación y análisis de la biblioteca SSH

La secuenciación y análisis de las secuencias de la biblioteca SSH, se realizó para identificar la posible función biológica de cada uno de los transcritos obtenidos. Los pasos a seguir desde la obtención de la biblioteca hasta la identificación de las ESTs se representan en la Figura 4.

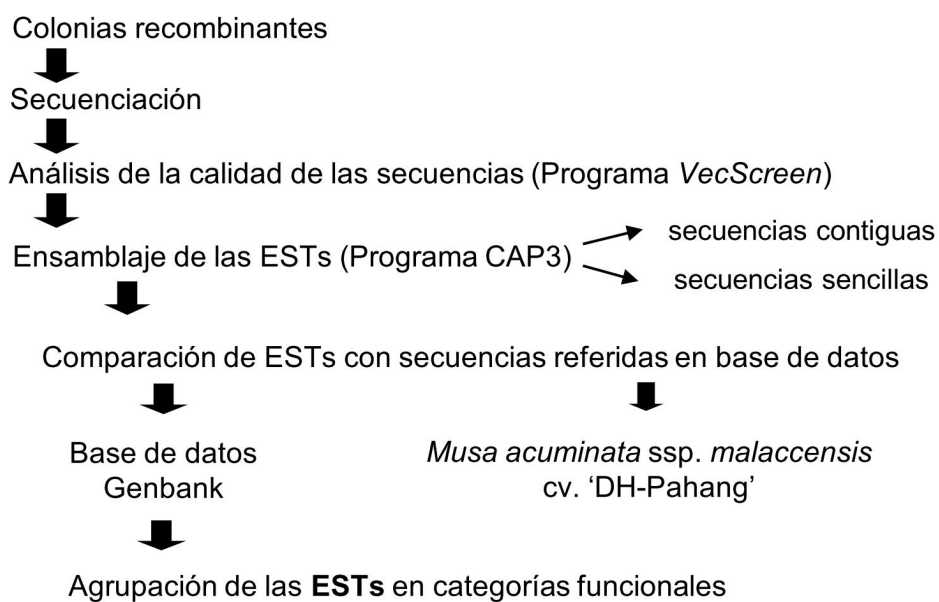


Figura 4. Procedimiento de trabajo a seguir para la identificación de las ESTs obtenidas de la biblioteca SSH creada a partir de el cultivar resistente 'Calcutta 4' en un estadio temprano de la infección con *Mycosphaerella fijiensis*.

Un total de 192 colonias seleccionadas al azar se enviaron a secuenciar a la compañía Macrogen (Seúl, Corea del Sur), en un secuenciador automático ABI 3730x1 (Applied Biosystems, EE.UU.). Todas las reacciones se realizaron desde el terminal 5' del ADN con el cebador directo universal M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3').

Las secuencias de la biblioteca SSH con poca calidad o con menos de 100 pares de bases (pb) en longitud se excluyeron del análisis. Para cada una de ellas, la eliminación

de los restos del vector se efectuó con el programa VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Posteriormente, se procedió al ensamblaje de las secuencias con la herramienta bioinformática CAP3 (CAP3, del inglés: *Sequence Assembly Program*), obteniéndose las secuencias sencillas (no ensambladas) y contiguas (ensambladas) (<http://www.pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) (Huang y Madan, 1999). La agrupación de las ESTs según su longitud, se realizó a partir de una tabla de frecuencia con el empleo de la estadística descriptiva. Para ello, se empleó el paquete estadístico SPSS versión 18,0 sobre Windows.

La búsqueda de homología para las ESTs se efectuó con el algoritmo *BlastX* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul *et al.*, 1997) con la base de datos no redundante (NR) del banco de genes (Genbank, del inglés: *Genetic Sequence Database*) el 14 de mayo de 2013 y también contra el genoma completo de referencia del doble haploide de *M. acuminata* var. Pahang ('DH Pahang') (*Musa* AA) desarrollado por el Centro Francés de Investigación en la Agricultura para el Desarrollo Internacional (CIRAD, del inglés: *French Agricultural Research Centre for International Development*) (<http://www.cirad.fr>), (<http://banana-genome.cirad.fr>) el 22 de mayo de 2013.

Para la identificación del origen de las ESTs, un valor de $E \leq 1e-05$ fue fijado como umbral de corte para considerar un alineamiento significativo.

La posible función biológica de las ESTs que presentaron alineamientos con secuencias de función conocida en la base de datos del Genbank, se determinó acorde con la clasificación en categorías funcionales descrita para proteínas de *Arabidopsis thaliana* en el catálogo MIPS (MIPS, del inglés: *Munich Information Center for Protein Sequences*) (<http://www.mips.gsf.de/proj/thal/db/index.html>).

3.2. Análisis cuantitativo de la expresión de las ESTs seleccionadas de la biblioteca SSH obtenida a partir de plantas de ‘Calcutta 4’ inoculadas con *M. fijiensis*

El análisis cuantitativo de la expresión para ESTs seleccionadas de la biblioteca SSH creada en un estadio temprano de la interacción ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis*, se efectuó por PCR en tiempo real con el propósito de obtener los perfiles de expresión de estos genes en el estudio de la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis* así como, de la compatible ‘Grande naine’- *M. fijiensis*. Para ello las ESTs se seleccionaron de acuerdo con la importancia del proceso biológico en que estaban involucradas y la función molecular que pudieran desempeñar en la interacción. Además, se incorporó el análisis del gen de la *Apx* de *M. acuminata* (secuencia tomada del Genbank) por su importancia en la detoxificación de ROS a nivel celular.

A partir del segundo experimento de inoculación artificial que incluyó plantas de ‘Calcutta 4’ y de ‘Grande naine’ descrito en el acápite 3, se tomaron muestras (de las hojas dos y tres) de tres plantas de cada uno inoculadas con *M. fijiensis* para cada punto de análisis (3, 6, 9, 12 y 15 dpi) y de plantas no inoculadas al inicio del experimento. Las hojas cortadas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se maceraron hasta obtener un polvo fino con ayuda de mortero y pistilo preenfriados. Finalmente, el tejido se conservó a -80°C hasta su utilización.

Para permitir la comparación de la expresión de genes entre la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis* con respecto a la compatible, se incluyeron plantas de ‘Grande naine’.

Purificación de ARN

Las extracciones de ARN total se realizaron acorde con el protocolo descrito por Liao *et al.* (2004) (Anexo 1). Para cada punto de análisis de la interacción, se mezclaron

0,5 g del tejido macerado (muestras de las hojas dos y tres) de cada una de las réplicas en estudio. En cada caso, la calidad del ARN y su integridad se determinó de igual modo al descrito en el acápite 3.1. Los ARN totales obtenidos fueron digeridos con *DNAse* (*TURBO DNA-free*TM, Ambion, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante.

La calidad de los ARN totales se analizó mediante la amplificación por PCR a partir de 150 ng de ARN total y de ADN genómico como control. Los cebadores para el gen *Act* (*Actina*) utilizados en el ensayo se diseñaron con el programa Primer3 (<http://www.simgene.com/primer3>) (Rozen y Skaletsky, 2000), basados en la secuencia del Genbank EF672732.1 de *M. acuminata*. Las condiciones de la reacción fueron: 10 μ M de los cebadores de *actina*, dNTPs 200 μ M, MgCl₂ 1,5 mM y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas, Alemania). La reacción procedió con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos (94°C por 45 s, 57°C por 30 s, 72°C por 45 s) con una extensión final a 72°C por 7 min. Los resultados de la amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) en tampón TBE 1X, el cual fue teñido con BrEt 0,5 μ g mL⁻¹.

Síntesis de ADNc

Los ARN totales de hojas de plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ (1 μ g) fueron convertidos en ADNc con el sistema comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EE.UU.). La calidad de los ADNc sintetizados se verificó por PCR con los cebadores de la actina bajo las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min seguida de 30 ciclos (94°C por 45 s, 57°C por 30 s, 72°C por 45 s) con una extensión final a 72°C por 7 min. Los resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) en tampón TBE 1X y visualizados mediante la tinción con BrEt 0,5 μ g mL⁻¹.

Análisis cuantitativo de la expresión

Dos ensayos de expresión independientes se efectuaron para permitir la comparación de los niveles de expresión de genes entre los bananos ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ ante la enfermedad del rayado negro de la hoja. Los cebadores para el análisis por PCR en tiempo real se diseñaron con el programa Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000), a partir de ESTs seleccionadas de la biblioteca SSH creada en la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis*. Para el gen *Apx* estos se diseñaron basados en la secuencia del Genbank AF146521.1 de *M. acuminata*. Los sitios de unión no-específica se analizaron por *Blast* (Altschul *et al.*, 1997), con respecto a las secuencias nucleotídicas disponibles para *Musa* spp. en la base de datos del Genbank. El gen *Act* de *M. acuminata* se tomó como referencia para normalizar la expresión de los genes de interés. Este proceso elimina las diferencias en las muestras (tal como cantidad y calidad del ARN) con el objetivo de identificar las variaciones reales específicas al gen (Vandesompele *et al.*, 2002). Para cada cebador la eficiencia de la amplificación, el coeficiente de correlación y el valor R^2 se calcularon con el programa *Rotor-Gene 3000* (Corbett, Australia). Los genes seleccionados y los cebadores utilizados en el estudio se muestran en el Anexo 3.

La temperatura óptima de anillamiento de los cebadores se determinó por PCR de gradiente bajo las siguientes condiciones: 10 μ M de cada cebador, dNTPs 200 μ M, $MgCl_2$ 1,5 mM y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas, Alemania). La reacción procedió con una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos (94°C por 45 s, (gradiente de 50°C a 60°C) 30 s, 72°C por 45 s), con una extensión final a 72°C por 7 min. Los resultados de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) en tampón TBE 1X, el cual fue teñido con BrEt 0,5 μ g mL⁻¹.

Las muestras para el PCR en tiempo real (ADNc sintetizado) se diluyeron individualmente 1:10 (aproximadamente 25 ng μ L⁻¹ del ARN inicial utilizado para la

síntesis del ADNc) y posteriormente se mezclaron las réplicas por cada punto para su utilización. Controles de no-transcripción se incluyeron en cada corrida para descartar la contaminación de las muestras de ARN total con ADN genómico y de no-muestra para asegurar la pureza de los reactivos.

Todas las reacciones de PCR en tiempo real se efectuaron en un volumen final de 20 μ L, con una concentración de cebadores de 0,5 μ M. Se utilizó la máquina *PCR Rotor-Gene 3000* (Corbett, Australia), con el sistema comercial *Maxima^R SYBR Green qPCR Master Mix 2X Kit* (Fermentas, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción procedió con una desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguida de 40 ciclos (95°C por 15 s, 57°C por 30 s, 72°C por 30 s). A partir de aquí, la temperatura de anillamiento se aumentó en 1°C cada 5 s hasta que se alcanzaron los 95°C, para analizar la especificidad de la amplificación (formación de dímeros y de un producto de amplificación específico para cada gen).

El rango de línea base óptima y los valores de ciclo umbral (C_t) por triplicado se promediaron y utilizaron para la cuantificación de los transcritos con el programa *Rotor-Gene 3000* (Corbett, Australia).

La expresión relativa de los genes de interés en cada muestra se normalizó internamente respecto al nivel de amplificación del gen de la *actina* y se informó como relativa al nivel normalizado del propio gen en las plantas no inoculadas (calibradores, (C)). Las veces de cambio de los genes en plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ inoculadas con *M. fijiensis* se calculó $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t = (C_{t, \text{gen de interés}} - C_{t, \text{gen actina}})_{\text{prueba}} - (C_{t, \text{gen de interés}} - C_{t, \text{gen actina}})_{\text{control}}$ (Livak y Schmittgen, 2001; Muller *et al.*, 2002).

3.2.1. Determinación de compuestos bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo, en plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ inoculadas con *M. fijiensis*

El análisis de compuestos bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo tuvo lugar para determinar los niveles del anión O_2^- y obtener los patrones de actividad enzimática (AE) peroxidasa en plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ inoculadas con *M. fijiensis*. Este análisis se hizo necesario a partir de la obtención de varias ESTs relacionadas con este proceso, en la biblioteca SSH creada en plantas de ‘Calcutta 4’ en un estadio temprano de la infección con este patógeno.

Preparación de las muestras

Se utilizaron muestras de plantas del mismo experimento de inoculación artificial empleado para los análisis de expresión por PCR en tiempo real. Para la extracción de las proteínas totales de plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ inoculadas con el aislado fúngico de *M. fijiensis* así como, de plantas no inoculadas en cada punto de análisis de la interacción a los 3, 6, 9, 12 y 15 dpi, se tomó el tejido macerado previamente congelado de hojas. Se procesaron tres réplicas biológicas por cada punto e independientemente las hojas dos y tres de cada planta. Se utilizaron 0,25 g de cada muestra de tejido el cual se homogenizó en 2 mL de solución tampón de Sodio-Fosfato 0,1 M (pH 7,0) con la adición de un inhibidor de proteasas (del inglés: *Protease Inhibitor Cocktail for General Use*) (Sigma-Aldrich, EE.UU.). El homogenizado se centrifugó a 10 000 g a 4°C por 20 min y el sobrenadante se utilizó para ambas determinaciones. Este se conservó a - 20°C en una congeladora vertical (Ing Climas, España) hasta su empleo.

Cuantificación del anión superóxido

Para la determinación del anión $O_2^{\cdot-}$ se midió la reducción del Nitroblue tretazolium (NBT) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) según el método descrito por Doke (1983). El extracto vegetal (0,03 mL) se incubó con 3 mL de tampón fosfato de potasio (0,01 M, pH 7,8) que contenía NBT 0,05% y NaN_3 (azida sódica) 10 mM, durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se calentó a 85°C por 15 min y luego se enfrió a temperatura ambiente. Los valores del anión $O_2^{\cdot-}$ se expresaron como incremento de la absorbancia a DO 580 nm (1h)/g de masa fresca.

Determinación de la actividad enzimática peroxidasa (EC 1.11.1.7)

La actividad POX fue determinada mediante un ensayo colorimétrico según Cakmak *et al.* (1993). La mezcla de reacción consistió en 1,05 mL de guayacol 0,05%, 0,03 mL del extracto enzimático y 0,35 mL de H_2O_2 1% y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se registró el incremento en la absorbancia debido a la oxidación del guayacol a una densidad óptica (DO) de 470 nm ($\xi = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), a intervalos de 20 s durante 3 min utilizando un espectrofotómetro UV-visible Genesys 6 (Thermo Electron Corporation, EE.UU.). El extracto vegetal calentado en agua hirviendo durante 5 min se utilizó como control (Hammerschmidt *et al.*, 1982). Los valores de la variable AE se expresaron como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de masa fresca.

Procesamiento estadístico

El procesamiento estadístico de los valores de las variables actividad enzimática y anión superóxido, se realizó con el programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versión 18,0 para Windows, con previa comprobación de los supuestos de normalidad y heterogeneidad de varianza, con un valor $p < 0,05$. Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, después de haber generado hasta 10 000 muestras

con distribución similar a la real mediante técnica de Monte Carlo, para estimar de esta forma la significación con el 95% de confianza.

3.3. Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides

Debido al creciente interés en algunos compuestos fenólicos derivados de la ruta de los fenilpropanoides del tipo fitoalexinas, encontrados en *Musa* spp., por su papel en la resistencia *in vitro* contra *M. fijiensis*, se propone el estudio de algunas ESTs involucradas en la vía metabólica. Las ESTs para los ensayos de expresión por PCR en tiempo real se seleccionaron de la biblioteca SSH realizada en un estadio tardío de la interacción compatible ‘Grande naine’-*M. fijiensis* (Portal *et al.*, 2011). Este estudio se realizó tanto para la respuesta incompatible como la compatible frente a este patógeno.

A partir de las ESTs seleccionadas de la biblioteca SSH todas las consideraciones para el diseño de los cebadores, análisis, determinación de temperatura de anillamiento y amplificación por PCR son similares a lo descrito en el acápite 3.2. Los genes seleccionados y cebadores utilizados se muestran en el Anexo 4.

Las muestras de hojas de las plantas de banano ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ inoculadas para los diferentes tiempos post infección y de las plantas no inoculadas, se obtuvieron del segundo experimento de inoculación artificial realizado en el acápite 3. La toma de las muestras, purificación de los ARN, síntesis del ADNc así como, las condiciones para el análisis cuantitativo de expresión, fueron similares a lo descrito en el acápite 3.2.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Identificación de transcritos de genes expresados en plantas de ‘Calcutta 4’ en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*

4.1.1. Construcción de una biblioteca SSH

Se logró mediante la utilización del protocolo de hibridación sustractiva por supresión, la construcción de una biblioteca SSH a partir de los ADNc sintetizados de los ARN totales extraídos de las hojas inoculadas, no inoculadas de ‘Calcutta 4’ y del micelio de *M. fijiensis*. La calidad de los ARN utilizados expresados como la relación 260/280 y 260/230 estuvo entre 1,8-2,0 (Anexo 5) y los niveles de pureza alcanzados concuerdan con los valores descritos por Sambrook y Rusell (2001). La biblioteca SSH generada en un estadio temprano de la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis*, como resultado de la clonación de los productos de la hibridación y posterior identificación en medio de cultivo selectivo, estuvo compuesta por 600 colonias.

4.1.2. Secuenciación y análisis de la biblioteca SSH

De las colonias obtenidas en la biblioteca SSH se seleccionaron 192 de forma aleatoria para su secuenciación, de las cuales se obtuvieron 98 secuencias útiles. Una vez eliminados los restos del vector y analizada la calidad de las secuencias se tomaron 96 de ellas para los análisis posteriores. La mayor frecuencia de distribución de las ESTs de acuerdo con su longitud estuvo entre 100-600 pb (74%), con mayor representatividad de fragmentos en el rango de 200-400 pb (34%) (Figura 5).

Como resultado del agrupamiento de las ESTs con el programa CAP3 se obtuvieron 67 secuencias únicas, de las cuales 49 eran ESTs sencillas (73,1%) y 18 ensambladas (26,9%). De los ensambles, 12 agrupaban dos ESTs (66,7%), cuatro agrupaban tres

ESTs (22,2%), uno agrupó cinco y otro seis ESTs (5,5%) respectivamente. El tamaño de inserto promedio obtenido para las secuencias fue de 534 pb.

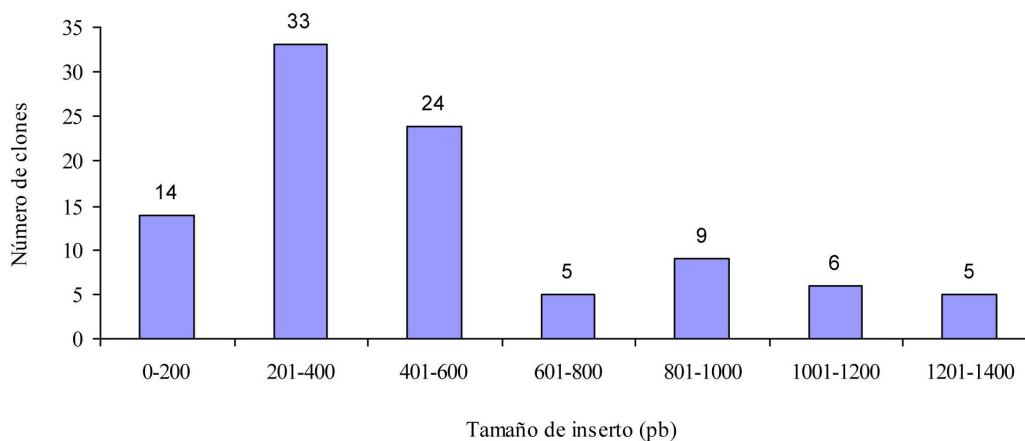


Figura 5. Distribución de la longitud de las secuencias obtenidas a partir de una biblioteca SSH realizada en un estadio temprano de la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*Mycosphaerella fijiensis*.

De acuerdo con la homología obtenida después de la comparación con la base de datos del Genbank, las ESTs de la biblioteca SSH se agruparon en doce categorías funcionales (Tabla 3). Los porcentajes correspondientes al número de ESTs agrupadas en cada categoría se muestran en la Figura 6.

Adicionalmente, todas las ESTs de la biblioteca SSH se compararon con el genoma completo de referencia de (‘DH Pahang’) (Anexo 6).

Los resultados del análisis de las ESTs de la biblioteca SSH con la base de datos del Genbank y con el genoma de (‘DH Pahang’) se muestran en la Tabla 4. Los porcentajes de identificación de las ESTs con o sin homología o sin clasificación en ambas bases fueron muy similares.

Tabla 3. Posible identidad y características de las secuencias seleccionadas de la biblioteca sustractiva por supresión, expresadas en hojas del cultivar resistente 'Calcutta 4' infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* en una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad, acorde con la base de datos del Genbank.

Clon	pb	BlastX: Secuencia de proteína relacionada	Organismo de referencia	Número de acceso a base de datos	Valor E
I. Fotosíntesis y Energía					
Ensamble 7	334	Subunidad N del centro de reacción del fotosistema I	<i>Solanum lycopersicum</i>	XP_004244730.1	9e-43
Ensamble 16	183	NADH deshidrogenasa subunidad β (EC: 1.6.5.3) (NDH)	<i>Typha angustifolia</i>	AAN32016.1	1e-26
Ca 41	285	Anhidrasa carbónica (EC: 4.2.1.1) (AC)	<i>Zea mays</i>	NP_001152905.1	7e-12
Ca 43g	261	Posible proteína de cloroplasto de unión a clorofila a-b (Cab)	<i>Sorghum bicolor</i>	ABB03717.1	1e-10
Ca 63	426	Proteína del cloroplasto del fotosistema II 10 kDa	<i>Arachis hypogaea</i>	ABC46708.1	1e-11
Ca 82	236	Proteína de unión a clorofila a-b (Cab)	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA06961.1	1e-05
Ca 98	348	Proteína 6A de unión a clorofila a-b, isoforma cloroplástica (Cab)	<i>Vitis vinifera</i>	XP002275552.1	4e-08
Ca 103	258	Proteína regulada por la luz Lir1 (Lir1)	<i>Picea abies</i>	AAX92704.1	3e-07
Ca 119	208	Proteína inducible del cloroplasto del fotosistema II (PI)	<i>Pachysandra terminalis</i>	ABI14811.1	6e-15
II. Estrés oxidativo					
Ensamble 2	608	Catalasa (EC: 1.11.1.6) (CAT)	<i>Campylobacter jejuni</i>	Q59296.1	3e-17
Ensamble 6	348	Posible tioredoxina tipo f (EC: 1.11.1.20) (TRX)	<i>Ricinus communis</i>	XP_002514830.1	3e-54
Ensamble 11	429	Proteína similar a metalotionina tipo-3 (MT)	<i>Musa acuminata</i>	Q40256.1	3e-22
Ensamble 14	454	Proteína similar a metalotionina tipo-3 (MT)	<i>Musa acuminata</i>	Q40256.1	6e-22
Ca 64	778	Proteína similar a metalotionina tipo-3 (MT)	<i>Musa acuminata</i>	Q40256.1	7e-17
III. Metabolismo primario					
Ca 68	383	Posible fumarilacetoacetato hidrolasa (EC: 3.7.1.2) (FAH)	<i>Lolium perenne</i>	AFA36589.1	1e-29
IV. Metabolismo secundario					
Ensamble 12	217	S-adenosilmetionina sintetasa (EC: 2.5.1.6) (SAMS)	<i>Musa acuminata</i>	ABG74576.1	4e-24
V. Mantenimiento celular					
Ca 6g	137	Proteína de transferencia conjugativa TrbL tipo P (Trbl)	<i>Afipia</i> sp.	WP_009337892.1	8e-10
VI. Transporte					
Ensamble 3	181	Permeasas de aminoácidos (AAPs)	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_oo2315914.1	2e-14

Tabla 3. Posible identidad y características de las secuencias seleccionadas de la biblioteca sustractiva por supresión, expresadas en hojas del cultivar resistente 'Calcutta 4' infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* en una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad, acorde con la base de datos del Genbank (continuación).

Clon	pb	BlastX: Secuencia de proteína relacionada	Organismo de referencia	Número de acceso a base de datos	Valor E
VII. Elementos transponibles					
Ca 243	455	Posible transposasa (EC: 2.1.1.43) (Tp)	<i>Escherichia coli</i>	WP_001424562.1	6e-78
VIII. Defensa					
Ensamble 17	439	Hidrolasa asociada a la pared celular (Hd)	<i>Medicago truncatula</i>	XP_003637074.1	2e-34
IX. Destino de proteínas					
Ensamble 13	421	Posible enzima conjugadora de la ubiquitina E2 (EC: 6.3.2.19) (E2)	<i>Oryza sativa</i>	NP_001047515.1	4e-63
X. Transducción de señales y tráfico intracelular					
Ca 4c	233	Receptor vacuolar (Rv)	<i>Zea mays</i>	ACG44286.1	3e-26
Ca 87	207	Factor de ribosilación ADP-proteína activadora de GTPasa AGD12 (GTPasa)	<i>Brachypodium distachyon</i>	XP_003577012.1	5e-24
XI. No clasificadas					
Ca 45	583	Proteína no caracterizada	<i>Solanum lycopersicum</i>	XP_004230480	9e-30
Ca 48	390	Proteína similar CASP	<i>Fragaria vesca</i>	XP_004294434.1	1e-05
Ca 128	863	Proteína hipotética	<i>Oryza sativa</i>	EAZ13376.1	3e-60
Ensamble 8	1305	Proteína hipotética	<i>Escherichia coli</i>	WP_001750129.1	3e-91
Ensamble 9	283	Proteína hipotética	<i>Oryza sativa</i>	EAY85654.1	4e-21
XII. No homología					
Ca 9	300	No homología			
Ca 16	1313	No homología			
Ca 19g	409	No homología			
Ca 22g	250	No homología			
Ca 24	408	No homología			
Ca 35	277	Proteína hipotética			
Ca42	227	No homología			
Ca 43	844	No homología			
Ca 46	1083	No homología			
Ca 47	1229	No homología			
Ca 52	1046	No homología			
Ca 60	872	No homología			
Ca 61	909	No homología			

Tabla 3. Posible identidad y características de las secuencias seleccionadas de la biblioteca sustractiva por supresión, expresadas en hojas del cultivar resistente 'Calcutta 4' infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* en una etapa temprana del desarrollo de la enfermedad, acorde con la base de datos del Genbank (continuación).

Clon	pb	BlastX: Secuencia de proteína relacionada	Organismo de referencia	Número de acceso a base de datos	Valor E
XII. No homología (continuación)					
Ca 66g	419				
Ca70	788				
Ca 72a	136	No homología			
Ca 72b	197	No homología			
Ca 74	949	No homología			
Ca 75	341	No homología			
Ca 77	1344	No homología			
Ca 79	1254	No homología			
Ca 84	270	No homología			
Ca 85	258	No homología			
Ca 88c	111	No homología			
Ca 91	191	No homología			
Ca 92	1003	No homología			
Ca 94	215	No homología			
Ca 94g	778	No homología			
Ca 95	804	No homología			
Ca 108	197	No homología			
Ca 113	188	No homología			
Ca 120	182	No homología			
Ca 132	289	No homología			
Ensamble 1	1219	No homología			
Ensamble 4	937	No homología			
Ensamble 5	1070	No homología			
Ensamble 10	1154	No homología			
Ensamble 15	360	No homología			
Ensamble 18	412	No homología			

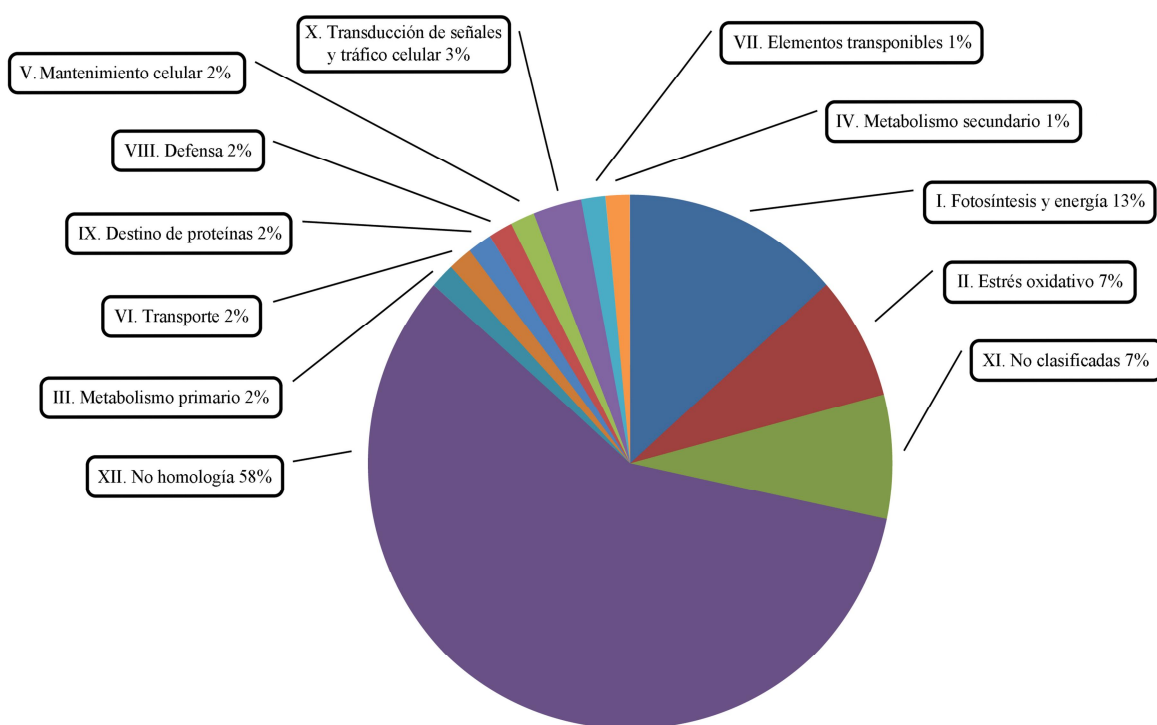


Figura 6. Agrupación por categorías funcionales de las secuencias identificadas de la biblioteca sustractiva por supresión a partir de la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*Mycosphaerella fijiensis*.

Tabla 4. Comparación de 67 ESTs de la biblioteca sustractiva por supresión con la base de datos del Genbank y con el genoma de referencia *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* var. Pahang ('DH Pahang').

Función relacionada	Genbank (No ESTs)	%	<i>Musa acuminata</i> ('DH Pahang') (No ESTs)	%
Función conocida y valor $E \leq 1e-05$	23	33	24	36
Función desconocida y valor $E \leq 1e-05$	5	8	6	9
Sin homología	39	59	37	55

En la categoría fotosíntesis y energía, se encontraron varias ESTs que codificaban para proteínas relacionadas con la estructura del cloroplasto y su funcionamiento tales como: las CAB (Proteínas unidoras de clorofila a-b), proteínas de los fotosistemas, la AC (Anhidrasa carbónica) y la NDH (NADH deshidrogenasa). La activación de estos genes

en la interacción está en correspondencia con la demanda de asimilatos que se necesita para el desarrollo de una respuesta de defensa efectiva en la planta.

En la clasificación de estrés oxidativo, se agruparon las ESTs que codificaban para las proteínas que forman los sistemas antioxidantes CAT, TRX (eliminadores de H₂O₂) y MT (elimina el radical OH[•]). En las plantas, la acumulación de ROS en el sitio de la infección así como, la supresión de las enzimas eliminadoras de las mismas, forman parte de la muerte celular programada o respuesta hipersensible. Además, estas ROS pueden actuar directamente sobre el patógeno y participar en la formación de barreras por medio del entrecruzamiento oxidativo de la pared celular (Apel y Hirt, 2004).

Relacionado con las alteraciones bioquímicas y fisiológicas que tienen lugar durante la interacción planta-patógeno, en la categoría de metabolismo primario se ubicó el gen que codificaba para la FAH (Fumarilacetoacetato hidrolasa), última enzima de la ruta catabólica del aminoácido tirosina. Su función en plantas no está bien dilucidada, aunque es esencial en la generación de metabolitos redox, tales como el tocoferol y la plastoquinona (Dixon y Edwards, 2006). Al respecto, se ha encontrado que ante señales asociadas con el estrés abiótico, la transcripción de genes que codifican para enzimas catabólicas de aminoácidos responde más rápido con respecto a los genes de rutas biosintéticas que codifican para enzimas alostéricas y no alostéricas (Less y Galili, 2008).

En la categoría de metabolismo secundario se ubicó el gen que codificaba para la enzima SAMS (S-adenosilmetionina sintetasa), la cual forma parte del ciclo de la metionina y es precursora de la biosíntesis de SAM (S-adenosilmetionina). A su vez, SAM es donadora de grupos metilo para una multitud de productos secundarios producidos en respuesta al ataque por patógenos y precursora de la biosíntesis de etileno y poliaminas (Bhuiyan *et al.*, 2007).

En la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* se obtuvo la expresión del factor de ribosilación ADP–proteína activadora de GTPasa (Arf-GTPase, del inglés: *ADP-Ribosylation Factor-Guanosine Triphosphatases*), el cual se ubicó en la categoría transducción de señales y tráfico intracelular. Las GTPasas pertenecen a la familia Ras GTPasa y a la super-familia de las pequeñas GTPasas y se consideran un interruptor molecular en la ruta de señalización de mecanismos de defensa. Además, participan en la regulación y transporte de vesículas, lo cual tiene un importante papel en la respuesta a estrés (Nielsen *et al.*, 2008).

En este sentido autores como Campo *et al.* (2008) demostraron la importancia en la interacción *O. sativa-M. oryzae*, de la inducción de una proteína unidora de GTP Ras-relacionada (Rgp1, del inglés: *Ras-related GTP-Binding Protein*) y de otra activadora de GTPasa (GAP, del inglés: *GTPase-Activating Protein*), en el transporte de proteínas asociado con vesículas. Por otra parte, Böhlenius *et al.* (2010), evidenciaron el papel que pueden tener estas proteínas en la resistencia a la penetración en *Hordeum vulgare* L. por el patógeno *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*.

En la interacción 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* la activación de una Arf-GTPasa pudiera estar relacionado con la maquinaria de transporte asociada con vesículas, para el traslado de proteínas entre los organelos. Este tráfico resulta esencial en la relación que se establece entre las plantas y los microorganismos (Böhlenius *et al.*, 2010).

En la biblioteca SSH se identificó un gen que codifica para una posible enzima conjugadora de la ubiquitina E2, relacionada con la degradación de proteínas a través del sistema ubiquitina/proteasoma, la cual se clasificó en destino de proteínas. La modificación de proteínas mediada por la ubiquitinación, es un mecanismo que regula aspectos de la fisiología celular como la homeostasis, el desarrollo, la división celular, el crecimiento y la respuesta a hormonas y estrés (Smalle y Vierstra, 2004). En este

sentido y relacionado con este proceso, Austin *et al.* (2002) demostraron que una defensa efectiva mediada por genes R en plantas de *A. thaliana* ante *Peronospora parasitica* y *P. syringae* pv. *tomato*, requería de los genes para la señalización de la resistencia ubicados en el complejo ubiquitina ligasa.

El papel de la ubiquitinación en la resistencia a enfermedades podría estar relacionado con la modificación de las proteínas señales y la regulación de procesos celulares tales como: la transcripción, el tráfico de proteínas, el transporte de membranas o la activación de proteínas kinasas (Pickart, 2001).

Como representante mayoritario de las enzimas que forman parte de la pared celular primaria, se ubicó la ESTs que codificaba para una hidrolasa asociada a la pared celular, en la categoría de defensa. La activación de este gen forma parte del complejo arsenal de defensa que se establece en la planta ante la entrada del patógeno, donde las hidrolasas de pared proveen de una barrera defensiva importante (Rose *et al.*, 2000). Dentro de ellas, las glucanasas y quitinasas son las más comunes y utilizadas en la búsqueda de resistencia ante patógenos fúngicos. En este sentido, la transformación genética de plantas del cv. 'Gros Michel' con dos genes de quitinasa provenientes de arroz, evidenció el papel de este gen en el aumento de la resistencia a *M. fijiensis* (Kovács *et al.*, 2012).

La categoría de transporte, estuvo representada por una ESTs que codifica para una permeasa de aminoácidos (AAPs), las cuales constituyen un subgrupo dentro de la super-familia de transportadores de aminoácidos (ATF, del inglés: *Amino Acid Transporter*) (Hunt *et al.*, 2010). Las AAPs se consideran reguladores clave del metabolismo en las plantas y su inducción en la interacción podría relacionarse con el transporte activo de aminoácidos, necesario para el desarrollo de una respuesta de defensa efectiva en la planta ante la infección por el patógeno.

En estrecha relación con el reordenamiento celular que tiene lugar en la planta durante su respuesta de defensa, se encontraron ESTs en la biblioteca SSH que codificaban para la Tp (Transposasa) y para Trbl (Proteína de transferencia conjugativa), las cuales se ubicaron en elementos transponibles y mantenimiento celular, respectivamente. Ambas categorías agruparon el 1% de las ESTs en la biblioteca SSH. Estos elementos transponibles tienen movilidad y son importantes en la creación de nuevos genes o modificando la función de los mismos (Bennetzen, 2000).

Finalmente, el mayor número de las ESTs de la biblioteca SSH no presentó homología con las secuencias anotadas en el Genbank.

Como resultado de la comparación de las ESTs de la biblioteca SSH con la base de datos (NR) del Genbank para proteínas y con el genoma de referencia ('DH Pahang'), se evidenció que para el mayor porcentaje de las secuencias de la biblioteca SSH no existe función biológica asignada. Aunque, el número de las ESTs publicadas en base de datos públicas es de 9 229 581 y específicamente de plantas hay 5 664 415 (consulta, 24 de mayo de 2013). Esto puede deberse fundamentalmente a la falta de anotación de las secuencias o a que las ESTs en estudio no comparten grandes regiones de homología con las publicadas en las bases de datos.

La comparación con el genoma ('DH Pahang') permitió corroborar la identidad de cada una de las secuencias analizadas en el Genbank. Además, evidenció la importancia de esta información para la identificación de las ESTs en el género *Musa* spp., a partir de los análisis de expresión de genes.

El gran número de ESTs obtenidas en la biblioteca SSH sin clasificación y sin homología aparente, podrían ser genes con probable función reguladora en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis*, las cuales no han sido identificados

con anterioridad. Esta información podría ser de gran utilidad para el entendimiento de las bases moleculares de la interacción.

Las investigaciones a nivel de transcriptoma, los cuales incluyen estudios de expresión de genes han contribuido al conocimiento de las interacciones planta-patógeno.

Los trabajos informados en *Musa* spp. sobre expresión de genes en su mayoría han sido encaminados a estudiar los aspectos fisiológicos de la maduración de la fruta (Xu *et al.*, 2007) y los efectos del estrés climático (Santos *et al.*, 2005). Sin embargo, en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis* estos estudios han sido poco abordados aunque, en los últimos dos años se ha incentivado la realización de este tipo de análisis.

En este sentido, Portal *et al.* (2011) identificaron genes involucrados en la síntesis de los fenilpropanoides, en la detoxificación, así como varias proteínas PR derivados del análisis de las bibliotecas de ADNc del tipo SSH y de cadena completa creada en plantas de 'Grande naine' ante la infección con *M. fijiensis*. Estos genes podrían estar involucrados en la respuesta de la planta ante la infección con *M. fijiensis*. Además de corroborar por PCR en tiempo real la expresión tardía de los genes *PR-4*, *C4h* (*Cinamato 4 hidroxilasa*) y similar a *osmotina* entre otros.

Por otra parte, D'Hont *et al.* (2012) tras el análisis de varias bibliotecas de ADNc completas, creadas en bananos con diferentes niveles de resistencia a la enfermedad del rayado negro de la hoja, concluyeron que el estudio de la interacción incompatible se debe realizar anterior a los 10 dpi. Finalmente, autores como Passos *et al.* (2012) del análisis de las bibliotecas completas creadas en un estadio temprano de la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* (4, 6, 7, 10, 12 y 14 dpi) y tardío de la infección de plantas de 'Grande naine' con este patógeno (19, 25, 31 y 39 dpi), limitaron los estudios de expresión solo a tres genes (*Mt*, *Pox* y *Oxo*).

Los resultados alcanzados en este acápite corroboraron la factibilidad de la creación de una biblioteca SSH, en plantas de ‘Calcutta 4’ en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, para la identificación de ESTs expresadas diferencialmente.

A partir de la información resultante del análisis de la biblioteca SSH creada en hojas de plantas de ‘Calcutta 4’ durante la interacción con el patógeno *M. fijiensis*, se seleccionaron ESTs relacionadas con el metabolismo primario, el secundario y el estrés oxidativo, para la realización de estudios de expresión de genes. Además, se incluyeron ESTs relacionadas con la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides, obtenidas de bibliotecas de ADNc realizadas en plantas de ‘Grande naine’ en un estadio tardío de la infección con *M. fijiensis*. El análisis de estas rutas a nivel molecular podría tener relevancia en la respuesta de defensa en bananos ante la infección por este patógeno, ya que las investigaciones a nivel transcriptómico al respecto están aún en su infancia.

4.2. Análisis cuantitativo de la expresión de las ESTs seleccionadas de la biblioteca SSH obtenida a partir de plantas de ‘Calcutta 4’ inoculadas con *M. fijiensis*

En plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’, se obtuvieron los perfiles de expresión para ESTs relacionadas con el metabolismo primario, el metabolismo secundario y con el estrés oxidativo, en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*.

ESTs relacionadas con el proceso de fotosíntesis

En la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis*, los perfiles de expresión para genes relacionados con el proceso de fotosíntesis, reveló la inducción del gen de la *subunidad N del centro de reacción del fotosistema I (PsI)* con un incremento de 13 veces del número de transcritos a los 6 dpi con respecto al calibrador. Sin embargo, se observó la inhibición del gen que codificaba para el *polipéptido del fotosistema II 10 kDa (PsII)*. Por otra parte, en las plantas de ‘Grande naine’ durante la respuesta

temprana a *M. fijiensis* se obtuvo la inhibición de los genes *PsI* y *PsII* como se observa en la Figura 7.

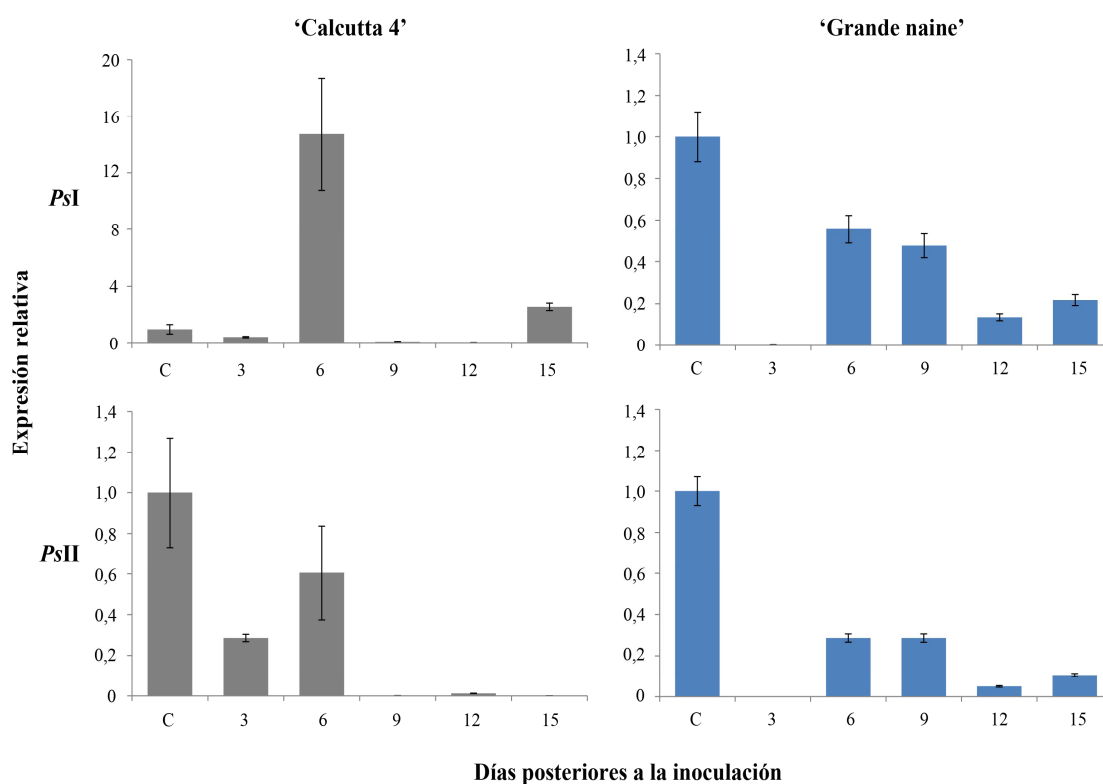


Figura 7. Perfiles de expresión de genes relacionados con el proceso de fotosíntesis durante la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*Mycosphaerella fijiensis* y compatible 'Grande naine'-*Mycosphaerella fijiensis*. Las muestras fueron colectadas a los 3, 6, 9, 12 y 15 días posteriores a la inoculación con el patógeno. Los valores de expresión de los genes *PsI* (*Subunidad N del centro de reacción del fotosistema I*) y *PsII* (*Polipéptido del fotosistema II 10 kDa*) fueron relativos a los niveles de expresión del calibrador C (plantas no infectadas, 0 dpi). El gen de la *actina* de *Musa acuminata* fue utilizado como gen de referencia. Líneas verticales indican el error estándar (n=3).

La respuesta obtenida en 'Calcutta 4' ante la infección con *M. fijiensis* podría ser el resultado de la demanda de esqueletos de carbono, energía y equivalentes reductores necesarios para desencadenar una respuesta de defensa efectiva. En correspondencia con lo que plantea Walters *et al.* (2008) aún cuando, en la planta se producen afectaciones por el patógeno, pueden quedar áreas alrededor del tejido afectado (islas verdes) donde se retarda la senescencia, se mantiene la actividad fotosintética y se

acumulan poliaminas. Además, se debe tener en consideración la existencia de una posible recuperación de la maquinaria fotosintética en las plantas de 'Calcutta 4' luego del probable daño ocasionado.

Es de destacar que en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* de acuerdo con los resultados obtenidos de la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis, aún en las áreas afectadas por el patógeno al parecer existe presencia de actividad fotosintética. Estas evidencias se correspondieron con lo observado a nivel histológico por Cavalcante *et al.* (2011), quienes encontraron presencia de clorofila en el tejido infectado de plantas de 'Calcutta 4' a los 10 dpi con este patógeno.

En la interacción compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis*, en una etapa inicial de la infección, la inhibición de los genes *PsI* y *PsII* hasta los 12 dpi, podría estar relacionada con la manipulación del metabolismo o con la supresión de la respuesta del hospedante por el patógeno para su supervivencia.

La disminución observada en estos genes está en correspondencia con las evidencias obtenidas por Hidalgo *et al.* (2006) en la interacción compatible entre el cv. susceptible 'Valery' (*Musa* AAA) y el patógeno *M. fijiensis*. Estos autores encontraron que la tasa fotosintética neta foliar y la tasa transpiratoria foliar (E) en las plantas decayeron en correspondencia con la severidad y el estadio de desarrollo de la enfermedad del rayado negro de la hoja, aunque el impacto del patógeno sobre E fue relativamente menor.

Por su parte, Cavalcante *et al.* (2011) a partir de estudios histológicos realizados en hojas de plantas de 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis*, encontraron que en células infectadas a los 10 dpi existía pérdida de clorofila en el tejido.

Los resultados de los perfiles de expresión para genes involucrados en el proceso fotosintético, tanto en la interacción incompatible como en la compatible *M. acuminata*-*M. fijiensis* no tienen precedentes en la literatura científica consultada.

Los estudios que relacionan la respuesta de defensa en la planta ante patógenos con las alteraciones que se producen en la fotosíntesis aún son limitados. Aunque investigaciones realizadas a nivel transcriptómico en diferentes patosistemas, han revelado que muchos genes relacionados con este proceso se inhiben ante el estrés biótico a diferentes niveles (Berger *et al.*, 2007; Bilgin *et al.*, 2010).

ESTs relacionadas con el metabolismo secundario

En la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis* el perfil de expresión obtenido para el gen del metabolismo secundario *Sams* reveló su máxima activación a los 6 dpi. Sin embargo, en la interacción compatible ‘Grande naine’-*M. fijiensis* ocurrió la inhibición de este gen como se observa en la Figura 8.

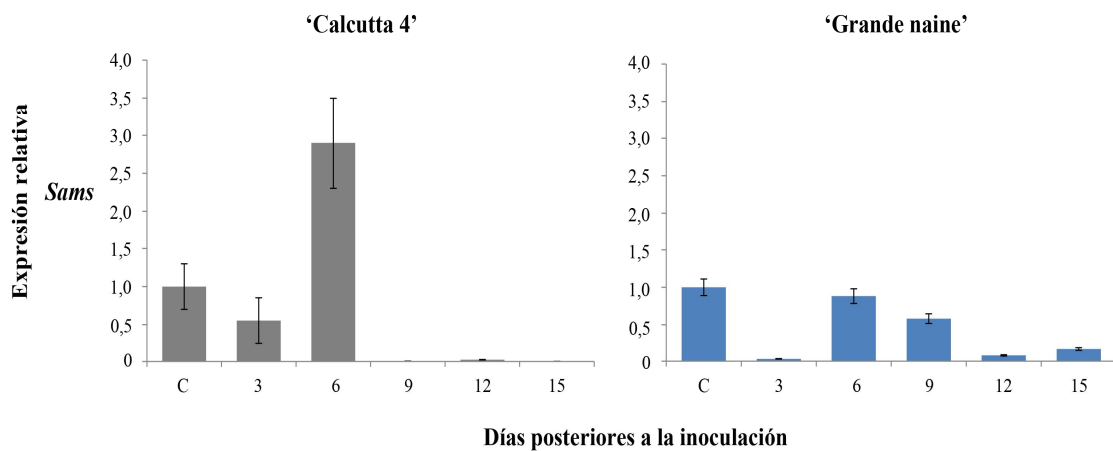


Figura 8. Perfiles de expresión del gen *Sams* (*S-adenosilmetionina sintetasa*) del metabolismo secundario de la planta durante la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*Mycosphaerella fijiensis* y compatible ‘Grande naine’-*Mycosphaerella fijiensis*. Las muestras fueron colectadas a los 3, 6, 9, 12 y 15 días posteriores a la inoculación con el patógeno. Los valores de expresión del gen fueron relativos a los niveles de expresión del calibrador C (plantas no infectadas, 0 dpi). El gen de la *actina* de *Musa acuminata* fue utilizado como gen de referencia. Líneas verticales indican el error estándar (n=3).

Pocos estudios avalan la relación entre la expresión del gen *Sams* y la respuesta defensiva en plantas ante patógenos. Solo en la interacción *T. monococcum*-*B. graminis* f. sp. *tritici* se demostró que altos niveles de transcritos del gen se relacionan con la tolerancia al estrés tanto biótico como abiótico (frío, heridas, sequía y cloruro de sodio) (Bhuiyan *et al.*, 2007).

En plantas de ‘Calcutta 4’, la activación transcripcional del gen *Sams* durante la infección con *M. fijiensis* pudiera estar en correspondencia con las múltiples funciones que desempeña en la planta. Entre ellas la biosíntesis de metionina y de la molécula precursora SAM necesaria para la producción de etileno y poliaminas como se observa en la Figura 9.

El etileno es inductor de fitoalexinas derivadas de la ruta de los fenilpropanoides en varias especies (Ishigaki *et al.*, 2004) y de genes efectores relacionados con la defensa, por la activación de factores de respuesta a etileno (ERF, del inglés: *Ethylene Response Factor*) (Broekaert *et al.*, 2006).

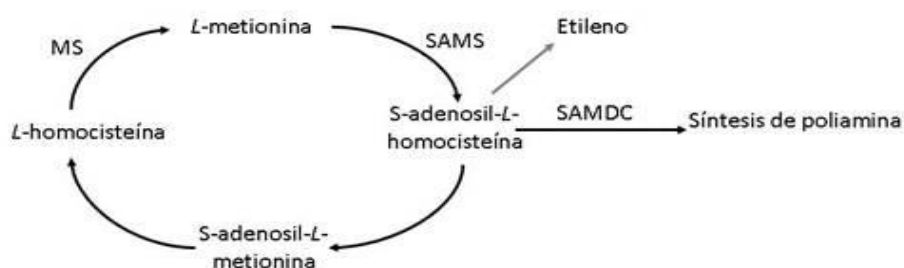


Figura 9. Representación esquemática de la ruta metabólica que conduce a la síntesis de etileno y poliaminas en plantas. SAMS: S-adenosilmetionina sintetasa, SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa, MS: Malato sintasa. (Adaptado por Oloriz *et al.* (2012)).

En este sentido, Gu *et al.* (2002) demostraron que en plantas de *A. thaliana* la resistencia a los patógenos *P. syringae* pv. *tomato* y *Erysiphe orontii* está relacionada con la expresión de los genes *ERF Pti4* y *Pti5*. Por otra parte, en plantas de *O. sativa* se

evidenció la importancia de la inducción de los genes para la síntesis de etileno *OsACS2* y *OsACO7* en la respuesta de resistencia a *M. grisea* (Iwai *et al.*, 2006).

En cuanto al papel de las poliaminas y su catabolismo en la resistencia a patógenos, durante la infección de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) con el virus del mosaico del tabaco (TMV, del inglés: *Tobacco Mosaic Virus*), la poliamina espermina indujo la biosíntesis de proteínas PR y de la HR (Walters, 2003). Además, en plantas de tabaco que sobreexpresaron la poliamina oxidasa se encontró tolerancia a la infección con *P. syringae* pv. *tabaci* y *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Moschou *et al.*, 2009).

En la interacción compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis*, la inhibición del gen *Sams* se observó en una etapa temprana de la inoculación con el patógeno. Al igual que con los genes del metabolismo primario *PsI* y *PsII*, la disminución en los niveles de expresión de este gen podría estar asociada con una probable manipulación del metabolismo del hospedante por parte del hongo o por una inhabilitación de la respuesta de defensa de la planta para su subsistencia.

ESTs relacionadas con el proceso de estrés oxidativo

Los perfiles de expresión obtenidos por PCR en tiempo real para plantas de 'Calcutta 4', en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, mostraron la máxima activación de los genes *Mt* y *Trx* a los 6 dpi y la inhibición de los genes *Apx* y *Cat*. Sin embargo, en la interacción compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* se obtuvo la inhibición de los genes *Apx*, *Cat* y *Mt* y la máxima expresión para *Trx* a los 9 dpi (Figura 10).

En un estadio temprano de la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis*, la inhibición de la expresión de los genes *Apx* y *Cat* podría ser parte de la estrategia de la planta de reprimir los principales sistemas antioxidantes, para contribuir con la

acumulación y mantenimiento de altos niveles de ROS necesarios en una respuesta defensiva efectiva.

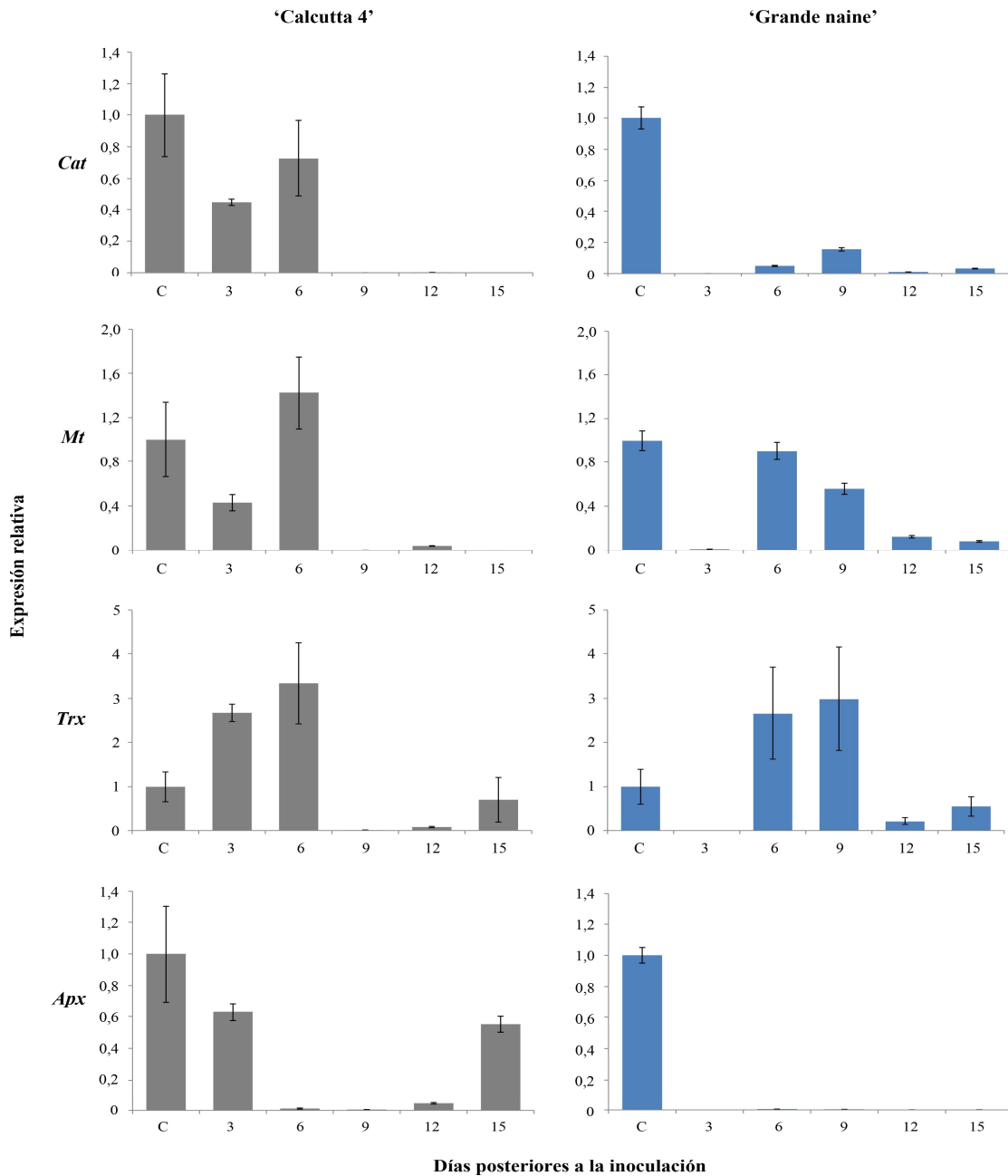


Figura 10. Perfiles de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo durante la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*Mycosphaerella fijiensis* y compatible 'Grande naine'-*Mycosphaerella fijiensis*. Las muestras fueron colectadas a los 3, 6, 9, 12 y 15 días posteriores a la inoculación con el patógeno. Los valores de expresión de los genes *Apx* (Ascorbato peroxidasa), *Cat* (Catalasa), *Mt* (Metalotionina) y *Trx* (Tioredoxina) fueron relativos a los niveles de expresión del calibrador C (plantas no infectadas, 0 dpi). El gen de la *actina* de *Musa acuminata* fue utilizado como gen de referencia. Líneas verticales indican el error estándar (n=3).

La catalasa cataliza la rápida conversión del H₂O₂ en agua y oxígeno tanto a nivel del cloroplasto como en el peroxisoma de la célula, aunque los mecanismos de su importación y regulación permanecen aún sin dilucidar (Mhamdi *et al.*, 2010). Según Kangasjarvi *et al.* (2012), es posible que las rutas que conllevan a la inhibición de este gen puedan ser parte de eventos que contribuyan al aumento intracelular de ROS, necesarios para activar otras vías como la síntesis de ácido salicílico (SA, del inglés: *Salicylic Acid*).

Aunque se ha informado en respuesta a la infección por patógenos, un aumento de la actividad catalasa y de sus niveles de transcriptos (Patykowski y Urbanek, 2003), su papel frente al estrés biótico resulta más complejo que respecto al abiótico, donde generalmente se correlaciona con la tolerancia de la planta (Oksanen *et al.*, 2003).

Shetty *et al.* (2007) informaron que en cultivares resistentes y susceptibles de trigo, la presencia de actividad catalasa durante el proceso de estrés oxidativo provocó mayor susceptibilidad en las plantas tanto en un estadio temprano como tardío de la infección con *M. graminicola*.

La inhibición de la transcripción del gen *Apx* en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*Mycosphaerella fijiensis* constituye una evidencia de la activación temprana del proceso de estrés oxidativo en la planta, después del reconocimiento del patógeno. La posterior recuperación de la capacidad antioxidante del gen a partir de los 12 dpi, pudiera relacionarse con su papel principal en el control de los niveles de H₂O₂ en la planta.

La APX es el principal sistema antioxidante presente en varios organelos celulares, forma parte del ciclo Ascorbato-Glutatión o ruta Assada-Halliwell-Foyer que ejerce una regulación muy estricta sobre la producción de ROS (Shigeoka *et al.*, 2002). Por tal motivo, la disminución de su actividad durante la interacción podría contribuir con el

desencadenamiento de una defensa efectiva en la planta. Según Clark *et al.* (2000) bajo condiciones de estrés biótico, el aumento de las concentraciones de ROS requiere de una disminución de los niveles y actividad de enzimas detoxificadoras de ROS tales como CAT y APX.

En este sentido, Mittler *et al.* (1999) demostraron en plantas transgénicas de tabaco, que la supresión de sistemas eliminadores de ROS como CAT y APX durante la respuesta hipersensible puede ser un paso crítico para lograr una eficiente defensa en el hospedante. Relacionado con estos genes otros autores como Kottapalli *et al.* (2007) durante la respuesta incompatible del cv. de arroz Ajaya al patógeno *X. oryzae* pv. *oryzae* arribaron a los mismos resultados.

La relevancia del sistema antioxidante APX fue observada por la sobreexpresión de la *Apx* del tilacoide (*tAPX*) en plantas transgénicas de tabaco (Yabuta *et al.*, 2002) y de *A. thaliana*, lo cual incrementó la tolerancia al estrés oxidativo causado por Paraquat (Murgia *et al.*, 2004).

En plantas de ‘Grande naine’ en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis* se observó la inhibición de los sistemas antioxidantes APX y CAT. La supresión de esta actividad antioxidante en la interacción compatible pudiera responder a una falla en la generación de H₂O₂. Al parecer, durante la etapa biotrófica de crecimiento de *M. fijiensis*, el patógeno coloniza la planta evitando su reconocimiento por el hospedante. Además, de igual modo a lo que ocurre en plantas de ‘Calcutta 4’ pudiera ser que la planta trata de minimizar la activación de los sistemas eliminadores de radicales, para lograr un aumento de los niveles celulares de ROS sin embargo, no se logra una respuesta efectiva, que pudieran estar condicionada por otros factores.

Relacionado con el proceso de estrés oxidativo en la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis*, se obtuvo la máxima expresión relativa a los 6 dpi del gen que codifica

para el sistema antioxidante MT, con un incremento del número de transcritos de 0,4 veces por encima del calibrador.

Las MT son polipéptidos de bajo peso molecular, que de acuerdo con la distribución de sus residuos de cisteína en plantas se clasifican en cuatro tipos (MT1-MT4) (Hassinen *et al.*, 2011). Estas proteínas desempeñan un importante papel en la regulación de la homeostasis de metales en la célula, en la respuesta a la toxicidad de metales y se consideran eliminadoras de radicales, aunque no se conoce ninguno de los mecanismos relacionados con estas funciones (Hassinen *et al.*, 2011). Su activación en un estadio temprano de la infección de plantas de ‘Calcutta 4’ con *M. fijiensis*, debe contribuir con la eliminación de radicales OH[·] originado durante la respuesta de defensa.

En este estudio, se observó el incremento de la expresión del gen similar a *Mt* tipo 3 en plantas de ‘Calcutta 4’ en respuesta a la infección con *M. fijiensis*. La inducción de esta isoforma del gen, coincidió con la activación de *Mt3* en hojas de *Abutilon theophrasti* Medik en respuesta al patógeno *Colletotrichum coccodes* (Dauch y Jabaji-Hare, 2006). Además, con los resultados informados por D'Hont *et al.* (2012) quienes en la interacción incompatible (‘DH Pahang’)-*M. fijiensis* también encontraron la activación de este gen. Es de resaltar, que según Passos *et al.* (2012) en la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis* la máxima inducción de otras isoformas como la del gen similar a *Mt* tipo 2 a los 6 dpi también se vinculó con la protección de la célula por la eliminación de ROS durante la respuesta hipersensible.

La activación de diferentes isoformas del gen *Mt* ha sido relacionada con la respuesta de la planta a patógenos. En este sentido, en plantas de arroz se ha demostrado que la expresión del gen *OsMT1* se relaciona con la defensa contra *M. oryzae* (Campo *et al.*, 2008) y Legay *et al.* (2011) destacaron la activación de *Mt1* y la represión de *Mt2* y *Mt3* en la respuesta de *V. vinifera* a la infección con *P. viticola*.

Por otra parte, a diferencia de la activación en la interacción incompatible del sistema antioxidante MT, en la compatible se observó su inhibición. Este resultado podría corresponderse con la presencia de bajas concentraciones de ROS, durante la etapa de desarrollo de la enfermedad analizada.

Finalmente, en la interacción incompatible se obtuvo el perfil para el gen *Trx* el cual mostró un aumento gradual de la expresión hasta alcanzar su máximo valor a los 6 dpi, con una inducción de 2,2 veces del número de transcritos con respecto al calibrador. La posterior inhibición y recuperación de la expresión del gen a partir de los 12 dpi, sugiere la existencia de alguna regulación a nivel transcripcional, relacionada con la presencia de ROS.

Las TRX son oxidoreductasas que pertenecen a una familia compleja de proteínas reguladoras, que residen en diferentes compartimentos celulares y funcionan en una amplia variedad de procesos (Montrichard *et al.*, 2009). Además, constituyen un sistema antioxidante complejo y eficiente en la eliminación de radicales hidroperóxidos que incluye al H₂O₂ producido a nivel celular (Martí *et al.*, 2011).

La expresión del gen *Trx*, en plantas de 'Calcutta 4' en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, se correspondió con la activación temprana del gen observada en plantas de arroz ante el patógeno *M. oryzae* (Campo *et al.*, 2008).

En este sentido, Rivas *et al.* (2004) evidenciaron en tomate que *CITRX* interactuaba físicamente con el gen *Cf9* y regulaba negativamente la vía de señalización a *C. fulvum*. Por su parte, Laloi *et al.* (2004) informaron acerca de la posible implicación de la tioredoxina citosólica AtTRXh5 en la respuesta de defensa de *A. thaliana* a *P. syringae* pv. *tomato* y al estrés oxidativo.

En la respuesta de defensa de la planta frente a patógenos, la tioredoxina forma parte de la ruta metabólica del SA donde media la conversión del oligómero inactivo no

expresadores de genes *PR* (*NPR1*, del inglés: *Non expressor of PR genes*) a monómero activo, el cual entra al núcleo y activa la expresión de los genes *PR1* (Tada *et al.*, 2008). Estas proteínas además, participan directamente en el control redox de varios procesos como por ejemplo: la activación de la primera enzima de la ruta del skikimato (3-Deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-P sintasa) (*DAHPS*; EC 2.5.1.54) (Entus *et al.*, 2002), regulan varias enzimas del metabolismo del carbono que incluye las del ciclo de Calvin (Lemaire *et al.*, 2007) y la síntesis de almidón (Kolbe *et al.*, 2005) entre otras funciones. Además, son vitales durante el proceso de síntesis de proteínas para la reducción del factor de elongación G (*EF-G*, del inglés: *Elongation Factor G*), cuya oxidación producida por H_2O_2 impide este proceso (Nishiyama *et al.*, 2011).

Sin embargo, en un estadio temprano de la interacción compatible ‘Grande naine’-*M. fijiensis*, se alcanzó la máxima activación del gen *Trx* a los 9 dpi con un incremento de dos veces del número de transcritos con respecto al calibrador. En comparación con la respuesta obtenida en las plantas resistentes cuya expresión máxima del gen se obtuvo a los 6 dpi, en las susceptibles se obtuvo en un momento más tardío y en menor magnitud. La presencia de altos niveles del gen en el patosistema pudiera relacionarse con las múltiples funciones reguladoras que desempeña a nivel celular (Montrichard *et al.*, 2009).

Evidencias experimentales obtenidas por Shetty *et al.* (2003) en la interacción compatible *T. aestivum*-*M. graminicola*, revelaron que en la etapa biotrófica de crecimiento de este patógeno hemibiotrófico, se producen bajos niveles de acumulación de H_2O_2 .

La información disponible sobre el momento y tipo de respuesta desarrollada en bananos después de la infección con *M. fijiensis* es aún limitada, lo cual se debe fundamentalmente a los escasos estudios relacionados con la caracterización molecular

de la defensa. Por este motivo, en la interacción *M. acuminata*-*M. fijiensis* se desconocen la mayoría de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados. Específicamente, los que relacionan el papel del metabolismo primario, el metabolismo secundario y el estrés oxidativo con la respuesta de defensa están en su infancia.

Los estudios de los perfiles de expresión obtenidos en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis* compatible e incompatible, revelaron acerca de los cambios transcripcionales específicos inducidos por el patógeno en el metabolismo de la planta. En este aspecto, autores como Bilgin *et al.* (2010) demostraron que durante la respuesta de la planta ante patógenos el metabolismo debe balancearse para responder tanto a la demanda de recursos para apoyar la defensa así como, a los requerimientos para el mantenimiento celular, crecimiento y reproducción (Bilgin *et al.*, 2010).

Según Bechtold *et al.* (2005), en la mayoría de las interacciones planta-patógeno tanto resistentes como susceptibles ocurren perturbaciones en la fotosíntesis, tales como una disminución en la cadena de transporte electrónico, reducción en la asimilación de dióxido de carbono (CO₂) y de la conductancia estomática.

En la respuesta incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* con la llegada del patógeno y su reconocimiento, se activan mecanismos de respuesta los cuales inducen la transcripción de genes en el núcleo de la célula. Esto implica un aumento en la demanda energética en las regiones infectadas y de esqueletos de carbono para la síntesis de compuestos secundarios con actividad antimicrobiana. Además, se produjo una activa transcripción del gen *Sams* involucrado en la ruta de biosíntesis de metionina y de unidades metilo necesarias para elevar los niveles de SAM y propiciar la activación de posibles vías de defensa como la síntesis de etileno y de poliaminas.

Por otra parte, en la respuesta compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* en un estadio temprano de la infección, la inhibición de los genes de los fotosistemas *PsI* y *PsII* y del

gen *Sams*, evidenciaron la poca actividad metabólica que tiene lugar durante la etapa de crecimiento biotrófica del hongo.

En la defensa temprana de la planta ante la infección por patógenos, la activación de procesos redox tiene un papel fundamental (Shetty *et al.*, 2008). La producción y acumulación de ROS que incluye al $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} entre otros, constituye una de las primeras respuestas celulares que estimula la cascada de defensa en varias especies de plantas, contra la infección con patógenos avirulentos o elicitores derivados del mismo. Sin embargo, altas concentraciones de ROS puede resultar en la oxidación no controlada de diversos componentes celulares, en la aparición de lesiones necróticas e incluso la muerte celular. Por tal motivo, para contrarrestar estos efectos la activación en la célula de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos eliminadores de estas especies tiene lugar (Torres, 2010)

Según Rizhsky *et al.* (2002), la invasión por patógenos comúnmente promueve un incremento transiente en la producción de ROS y las plantas con niveles disminuídos de los sistemas antioxidantes son una evidencia de la existencia de estrés oxidativo, a pesar de no existir niveles detectables de ROS.

En la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* la expresión máxima para los genes *Mt* y *Trx* a los 6 dpi y la inhibición de *Apx* y *Cat* así como, en la interacción compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* la inhibición de los genes *Apx*, *Cat* y *Mt* y la activación de *Trx*, demostraron la importancia que podría tener la inducción del proceso de estrés oxidativo en la respuesta de la planta ante la infección por patógenos.

En plantas de 'Calcutta 4' posterior a la inoculación con el patógeno *M. fijiensis*, al parecer ocurre la producción y acumulación de ROS asociado con el estallido oxidativo, lo cual podría constituir un elemento fundamental en la respuesta de defensa a *M. fijiensis*. En estudios previos realizados en este patosistema, una rápida acumulación de

ROS seguida por una respuesta hipersensible se ha correlacionado con la resistencia en 'Calcutta 4' ante *M. fijiensis* (Cavalcante *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012). Aunque, se requiere de estudios funcionales para determinar si esta respuesta es esencial o no y para conocer el grado de contribución de la misma al fenotipo de resistencia.

Como se ha descrito previamente la APX y la CAT son los principales sistemas enzimáticos detoxificantes de H₂O₂ a nivel celular (Foyer y Noctor, 2009). En plantas susceptibles de 'Grande naine' la inhibición de estos genes y del gen *Mt*, pudiera relacionarse con la presencia de bajos niveles de ROS en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*.

Debido a la función que podría desempeñar la inducción del proceso de estrés oxidativo en la respuesta de defensa de 'Calcutta 4' frente a *M. fijiensis* y teniendo en cuenta los cambios obtenidos en los perfiles de expresión de los genes que codifican para los sistemas antioxidantes CAT, APX, MT y TRX durante el análisis de las interacciones 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* y 'Grande naine'-*M. fijiensis*, se decidió estudiar la relación existente entre la expresión de estos genes anteriormente mencionados y la acumulación del radical O₂⁻ y la actividad POX durante el proceso infeccioso.

4.2.1. Determinación de compuestos bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo, en plantas de 'Calcutta 4' y 'Grande naine' inoculadas con *M. fijiensis*

Para plantas de 'Calcutta 4' y 'Grande naine', fueron obtenidos los niveles de acumulación de O₂⁻ así como, los niveles de actividad peroxidasa en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis* como se observa en las Figuras 11 y 12.

Cuantificación del anión superóxido

En la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis*, al parecer ocurren dos estallidos oxidativos los cuales se evidenciaron por la máxima acumulación del anión O₂⁻ a los 6

dpi y en una etapa más avanzada de la interacción a los 12 dpi. Sin embargo, en la interacción compatible ‘Grande naine’-*M. fijiensis* el mayor valor para el anión se obtuvo a los 12 dpi (Figura 11).

Los resultados mostrados tienen cierta correspondencia con los obtenidos en un estudio similar realizado por Sánchez-García (2010) en las mismas interacciones, donde la acumulación máxima del anión O_2^- en plantas de ‘Calcutta 4’ ocurrió a los 6 dpi, con un nuevo aumento a los 10 dpi y para plantas de ‘Grande naine’ el mayor valor del anión se obtuvo a los 10 dpi.

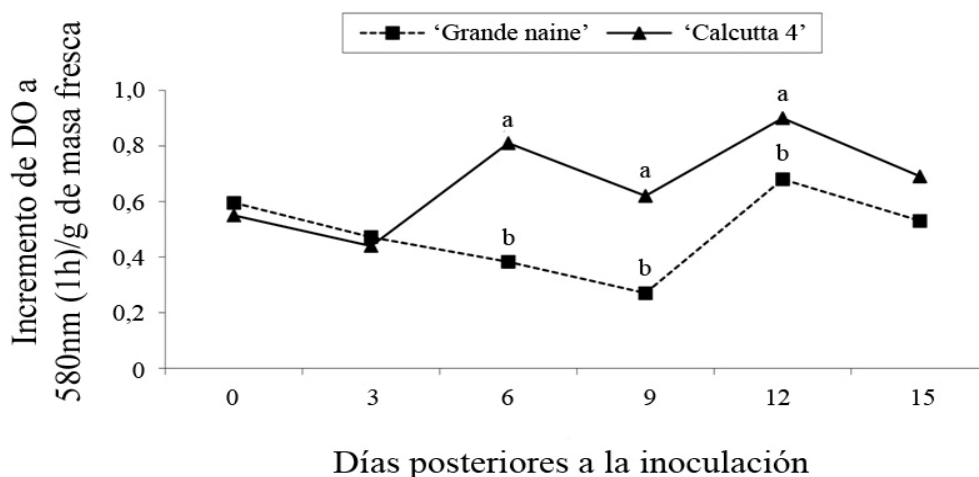


Figura 11. Acumulación del anión superóxido (O_2^-) en hojas de plantas del cultivar resistente ‘Calcutta 4’ y del susceptible ‘Grande naine’ inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*, a diferentes días posteriores a la inoculación. Valores medios con letras desiguales en cada tiempo difieren por la prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

En la interacción incompatible ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis*, el mayor valor del anión O_2^- a los 6 dpi sugirió la existencia de posibles moléculas de reconocimiento del patógeno en las plantas, capaces de inducir una rápida respuesta de defensa. Sin embargo, en el cv. ‘Grande naine’ al parecer la planta trata de responder ante la infección con el patógeno aumentando los niveles de O_2^- pero en un momento más tardío, lo cual no garantiza una respuesta de defensa efectiva en la planta.

El papel de ROS en la respuesta de defensa en la planta ha sido demostrado por varios autores. En este sentido, Able *et al.* (2000) manifestaron el papel determinante de ROS en la respuesta de defensa de plantas de *N. tabacum* ante la infección con *P. nicotianae*. De igual modo, Romero *et al.* (2008) en la interacción *Cucumis melo* L.-*Podosphaera fusca* (Fr.) Braun & Shishkoff manifestaron la importancia de la generación temprana de H_2O_2 y O_2^- en la respuesta hipersensible desarrollada en plantas resistentes.

Determinación de la actividad enzimática peroxidasa (EC: 1.11.1.7)

En plantas de ‘Calcutta 4’ y ‘Grande naine’ los perfiles de actividad POX mostraron variaciones significativas en la actividad enzimática, en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis* como se observa en la Figura 12.

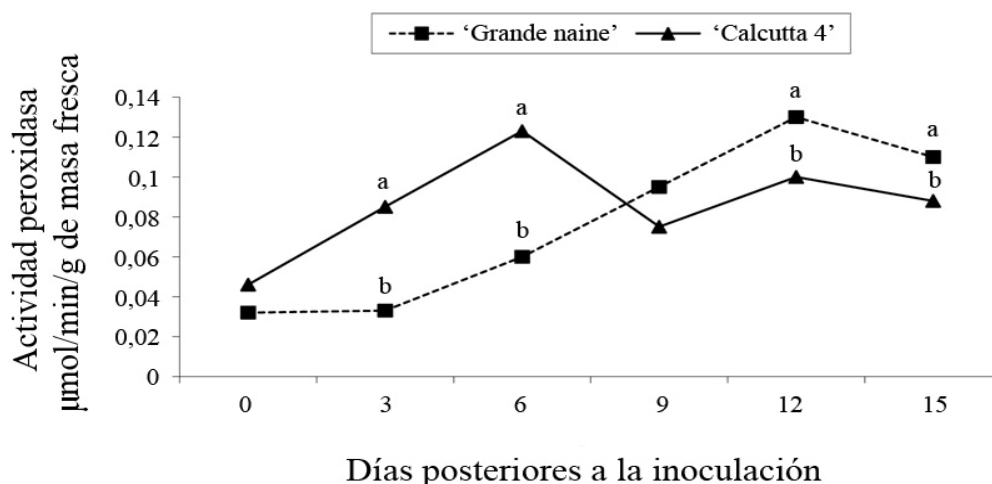


Figura 12. Actividad peroxidasa en hojas de plantas del cultivar resistente ‘Calcutta 4’ y del susceptible ‘Grande naine’ inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*, a diferentes días posteriores a la inoculación. Valores medios con letras desiguales en cada tiempo difieren por prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

En la interacción ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis*, ocurrió una temprana inducción de la enzima POX cuya actividad fue máxima a los 6 dpi seguida de un ligero incremento a los 12

dpi. Este aumento sugirió su posible papel en la respuesta de defensa de la planta contra *M. fijiensis* y pudiera ser un mecanismo de protección celular contra ROS.

En un estudio similar realizado en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* por Cavalcante *et al.* (2011), la acumulación de H₂O₂ en paralelo con el incremento de la actividad POX, se vinculó con una respuesta similar a la hipersensible. De igual modo, Torres *et al.* (2012) y Passos *et al.* (2012) correlacionaron los niveles de actividad POX y la máxima expresión del gen *Pox* a los 6 dpi respectivamente, en esta interacción con este tipo de respuesta.

En este sentido, los resultados obtenidos por Shetty *et al.* (2003) también vincularon la inducción de peroxidasas y la acumulación de transcritos de una peroxidasa apoplástica en *T. aestivum*, con la resistencia al patógeno *M. graminicola*. De igual forma las evidencias obtenidas por Shetty *et al.* (2007) en esta interacción corroboraron el papel determinante que desempeña la presencia de H₂O₂ en la resistencia de las plantas.

En la interacción 'Grande naine'-*M. fijiensis* la máxima actividad POX obtenida a los 12 dpi pudiera relacionarse con cambios en su fase de crecimiento. Los factores que determinan este cambio no se conocen pero se relacionan con la presencia de fitotoxinas lipofílicas secretadas como el juglone (El Hadrami *et al.*, 2005). En estudios recientes se determinó el posible papel de las fitotoxinas hidrofílicas producidas por *M. fijiensis* en la patogénesis (Cruz-Cruz *et al.*, 2009; Cruz-Cruz *et al.*, 2011).

Las peroxidasas además de estar relacionadas con el metabolismo de las auxinas, el fortalecimiento de la pared y la síntesis de fitoalexinas, están involucradas en el metabolismo de ROS durante la respuesta de defensa en la planta (Almagro *et al.*, 2008).

La presencia del gen *Pox*, así como los niveles de actividad de la enzima han sido de gran importancia en el estudio de las interacciones planta-patógeno. Se plantea que la muerte celular inducida por H_2O_2 es esencial en la respuesta hipersensible ante patógenos (Gechev *et al.*, 2005) y que a pesar de los avances alcanzados en el conocimiento de la fisiología del H_2O_2 y de varios componentes que forman parte de la red de señalización, aún queda mucho por descubrir al respecto (Petrov y Van Breusegem, 2012).

Las principales diferencias que se establecieron en la actividad POX entre las plantas resistentes y las susceptibles a la enfermedad del rayado negro de la hoja, tuvo lugar en un estadio temprano de la infección. Al parecer, en el banano ‘Calcutta 4’ a partir del reconocimiento inicial del patógeno se producen señales que determinan la rápida inducción de una respuesta de defensa y se establece un período de ventana crítico en el cual se define la infección con *M. fijiensis*.

Por otra parte, se conoce que *M. fijiensis* crece lentamente en concentraciones de H_2O_2 de 50 y 75 $mmol L^{-1}$ y que ROS puede asegurar un bloqueo en el crecimiento del hongo y/o en el paso a un estilo de vida necrotrófico, con lo que le da ventajas a otros componentes importantes en la resistencia de ‘Calcutta 4’ (Beltrán-García *et al.*, 2009).

Los ensayos bioquímicos realizados verificaron la inducción y máxima acumulación de ROS a los 6 dpi en plantas de ‘Calcutta 4’, lo cual concuerda con los resultados previos de expresión de genes realizados en la interacción. Sin embargo, en plantas de ‘Grande naine’ la máxima actividad POX y acumulación del anión $O_2^{\cdot -}$ se obtuvieron más tardíamente, con respecto a las plantas resistentes, a los 12 dpi. Estos resultados se correspondieron con un ligero incremento de la expresión de los sistemas antioxidantes TRX y CAT a partir de ese momento.

Con el desarrollo de los diferentes ensayos bioquímicos en la interacción *M. acuminata*-*M. fijiensis*, se corroboró la activación del proceso de estrés oxidativo por la acumulación del anión O_2^- y la presencia de actividad POX en los cultivares estudiados. En la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* la obtención de valores máximos de acumulación para el anión O_2^- , de actividad peroxidasa y de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo a los 6 dpi, evidenciaron que al parecer, la producción de una explosión oxidativa en un estadio temprano de la infección podría estar asegurando los niveles de ROS para desencadenar una respuesta defensiva efectiva en bananos frente a *M. fijiensis*.

En este acápite se demostró que en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* ocurre la activación de los genes relacionados con el metabolismo *PsI* y *Sams* y de los genes relacionados con el estrés oxidativo *Mt* y *Trx*. Los cambios en la expresión de los genes relacionados con el proceso redox en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, aseguraron la presencia de niveles de ROS para desencadenar una respuesta de defensa efectiva, lo cual se corroboró con los ensayos bioquímicos realizados. Sin embargo, en la interacción compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* la inhibición de los genes del metabolismo *PsI*, *PsII* y *Sams* y del estrés oxidativo *Apx*, *Cat* y *Mt* y la activación del gen *Trx*, al parecer no logran asegurar la resistencia a *M. fijiensis* en las plantas de banano susceptibles durante el período de la interacción analizado.

4.3. Análisis cuantitativo de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides

A través del PCR en tiempo real fue posible determinar en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* así como, en la compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis*, los perfiles de expresión para el gen central de la ruta metabólica de los fenilpropanoides

C4h y para los genes *Chs* (*Chalcona sintasa*) e *Irl* (Similar a la *Isoflavona reductasa* (denominada IRL en no leguminosas) de la rama de los flavonoides (Figura 13).

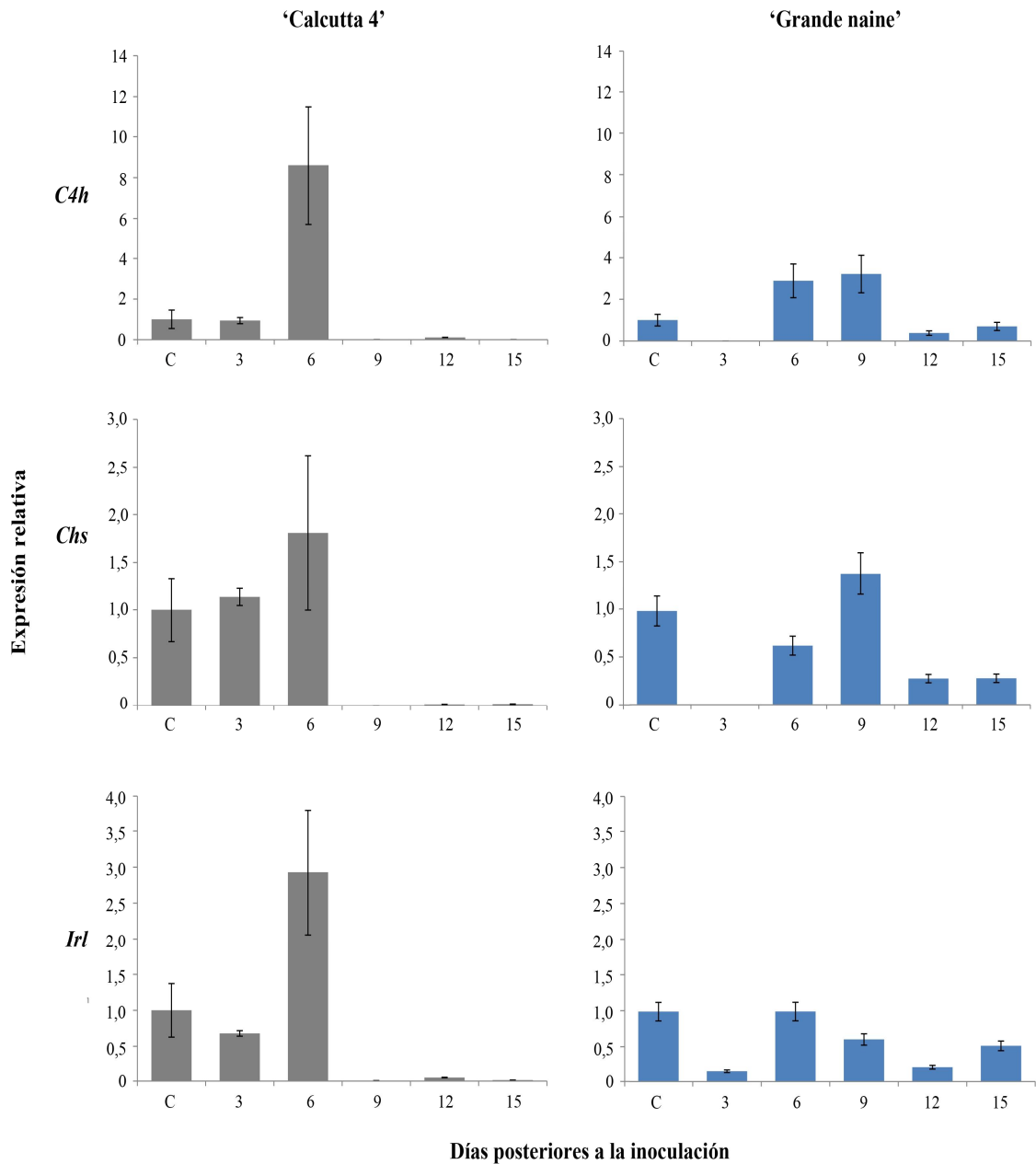


Figura 13. Perfiles de expresión de genes relacionados con la ruta metabólica de los fenilpropanoides durante la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*Mycosphaerella fijiensis* y compatible 'Grande naine'-*Mycosphaerella fijiensis*. Las muestras fueron colectadas a los 3, 6, 9, 12 y 15 días posteriores a la inoculación con el patógeno. Los valores de expresión de los genes *C4h* (*Cinamato 4 hidroxilasa*), *Chs* (*Chalcona sintasa*) e *Irl* (Similar a la *Isoflavona reductasa*) fueron relativos a los niveles de expresión del calibrador C (plantas no infectadas, 0 dpi). El gen de la *actina* de *Musa acuminata* fue utilizado como gen de referencia. Líneas verticales indican el error estándar (n=3).

En la interacción ‘Calcutta 4’-*M. fijiensis*, se confirmó la activación de la ruta de los fenilpropanoides y se obtuvo la máxima expresión a los 6 dpi de los genes *C4h*, *Chs* e *Irl*, con un incremento del número de transcritos de 7,3, 0,8 y 1,8 veces respectivamente, con respecto al calibrador. La inducción de estos genes podría ser parte de la respuesta defensiva de las plantas ante este patógeno.

Del análisis cuantitativo de la interacción compatible ‘Grande naine’-*M. fijiensis*, se obtuvo la máxima expresión de los genes *C4h* y *Chs* ocurrió a los 9 dpi, con un aumento del número de transcritos de solo 2,0 y 0.4 veces respectivamente, con respecto al calibrador y la inhibición del gen *Irl* a partir de los 6 dpi. Esta respuesta fue más tardía y en menor magnitud comparada con la desarrollada en las plantas de ‘Calcutta 4’, donde existió una activación más temprana y de mayor proporción de los genes clave en la ruta de síntesis de los fenilpropanoides.

La expresión del gen *C4h* pudiera asociarse con la síntesis de metabolitos derivados de la ruta como la calosa, involucrados en el fortalecimiento de la pared para crear una barrera que evite la entrada del patógeno. Por otra parte, la activación de la rama de los flavonoides y dentro de ella la de los isoflavonoides, podría estar relacionada con la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas.

Estudios realizados por Dixon *et al.* (2002) demostraron la relevancia de los compuestos fenólicos derivados de la ruta de los fenilpropanoides, en la respuesta de la planta ante la invasión por patógenos. Aunque pocas investigaciones avalan el papel del gen *C4h* en la interacción, estos autores destacaron su importancia en la deposición de compuestos fenólicos solubles y unidos a la pared celular.

Teniendo en cuenta la relevancia que puede tener la expresión del gen *C4h* en la ruta de los fenilpropanoides, también se le atribuyó a este gen un papel significativo en la

lignificación. Así lo demostró Sewalt *et al.* (1997) quienes encontraron correspondencia entre la actividad del gen y la producción de lignina en plantas de tabaco.

La activación tardía del gen *C4h* en plantas de 'Grande naine' durante la respuesta a *M. fijiensis*, revelada por Portal *et al.* (2011), también ejemplificó el posible papel de este gen en la interacción.

En la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* la máxima expresión relativa del gen *Chs* se obtuvo a los 6 dpi.

Estudios realizados en otros patosistemas han confirmado el posible papel del gen *Chs* en la resistencia a patógenos en plantas. En este sentido, la represión del gen *Chs* y la ruptura de la ruta de los flavonoides, puede afectar la respuesta de defensa tal como se demostró en plantas de *C. sativus* frente al patógeno biotrófico *P. xanthii* según Fofana *et al.* (2005). Además, la relación existente entre la acumulación temprana de altos niveles de transcritos del gen *Chs* y la respuesta de defensa a patógenos, se observó en plantas de *Glycine max* L. ante el patógeno *P. syringae* pv. *glycinea* por Zabala *et al.* (2006).

La CHS es la primera enzima de la ruta biosintética de los flavonoides, miembro de la familia de las poliketido sintasas, que conduce a la síntesis de todas las fitoalexinas tipo flavonoides y de las antocianinas en plantas (Dixon *et al.*, 2002).

El perfil de expresión obtenido para el gen *Irl* en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* mostró un incremento del número de transcritos de 1,8 con respecto al calibrador. Sin embargo, en la interacción compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* se observó su inhibición.

El gen *Irl* pertenece a la rama de los isoflavonoides dentro de la ruta de los flavonoides y su estudio está limitado principalmente a plantas leguminosas (Dixon *et al.*, 2002).

Pocos estudios relacionan la función que desempeña este gen en plantas y en bananos su inducción se obtuvo en presencia de etileno (Gupta *et al.*, 2006) y en la respuesta tardía de plantas de 'Grande naine' a la infección con *M. fijiensis* (Portal *et al.*, 2011). Además, la sobreexpresión en plantas de arroz del gen *OsIRL* sugirió su papel en la homeostasis de ROS (Kim *et al.*, 2010).

Los resultados alcanzados evidenciaron la activación de la ruta de los fenilpropanoides en la interacción compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis*, con la diferencia de que ocurrió en un momento posterior con respecto a la incompatible y en menor cuantía.

Para los tres genes en estudio en la interacción compatible se observó una tendencia al incremento de su expresión a partir de los 12 dpi. Esto podría relacionarse con una posible respuesta de defensa en la planta, en este momento de la interacción en que las plantas pudieran estar en el estado 1 de desarrollo de la enfermedad del rayado negro de la hoja, caracterizado por pequeñas lesiones puntiformes de coloración rojiza por la parte abaxial y sin síntomas en la parte adaxial según la escala de síntomas propuesta por Alvarado-Capó *et al.* (2003). Específicamente, la expresión del gen *C4h* observada en esta interacción a los 12 dpi, se corresponde con los resultados de expresión demostrados por Portal *et al.* (2011) en un estadio tardío de la interacción compatible.

Es de destacar, que a pesar del conocimiento existente relacionado con el papel de los compuestos fenilpropanoides en la respuesta de defensa de la planta (Dixon *et al.*, 2002), se necesita un mayor número de estudios que contribuyan a dilucidar sus rutas de síntesis.

En el género *Musa* spp. la identificación de fitoalexinas del tipo fenalenonas (también conocidas como perinaftenonas) y sus fenil derivados (Otálvaro *et al.*, 2002b; Otálvaro *et al.*, 2007; Hidalgo *et al.*, 2009), con actividad antifúngica *in vitro* contra *M. fijiensis* además de, la propuesta de las fenilfenalenonas como posible fungicida para el control

de la enfermedad del rayado negro de la hoja, constituyen evidencias importantes del posible papel de esta ruta en la estrategia de defensa en el género.

La activación de la ruta de los fenilpropanoides tanto en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* como en la compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* y específicamente la inducción temprana y en mayor magnitud de los genes en plantas resistentes con respecto a las susceptibles, podría proveer nuevas evidencias acerca del posible papel de la vía en la respuesta de defensa en *Musa* spp. ante este patógeno.

Las investigaciones en el género *Musa* spp. han constituido una prioridad en los estudios llevados a cabo por la comunidad científica internacional dedicada a la temática. A pesar de los esfuerzos realizados en la búsqueda de genes de interés relacionados con la resistencia a la enfermedad del rayado negro de la hoja, aún no se logran resultados satisfactorios. Por lo que se continúa con las investigaciones enfocadas hacia la obtención de nuevas fuentes de resistencia, a lo cual los análisis a nivel molecular han hecho una gran contribución.

La realización de un estudio a nivel transcriptómico en la interacción *M. acuminata*-*M. fijiensis* en un estadio temprano de la infección, representa un paso de avance para un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta de defensa de las plantas de banano frente a este patógeno.

En el presente trabajo se profundizó en el conocimiento de las bases moleculares de la interacción *M. acuminata*-*M. fijiensis*, con la creación de una biblioteca SSH a partir de hojas de plantas del banano resistente 'Calcutta 4' en un estadio temprano de la infección con este patógeno. Como resultado de este análisis, las ESTs se ubicaron en las siguientes categorías funcionales: fotosíntesis y energía, estrés oxidativo, metabolismo primario, metabolismo secundario, mantenimiento celular, transporte,

La figura representa un esquema a modo de resumen los principales resultados obtenidos en esta investigación, que incluye todos los productos de los genes identificados en la SSH y otros genes también estudiados. Una gran representación de ESTs relacionadas con la fotosíntesis y energía localizados a nivel del cloroplasto muestra la contribución de estos a la defensa de la planta. Si tenemos en cuenta la sobreexpresión diferencial del gen *PsI* a los 6 dpi, podemos considerar la importancia de la fotosíntesis en el cultivar resistente, asegurando los altos niveles de asimilatos de carbono durante la demanda energética impuesta por la defensa de la planta.

Otro grupo importante de genes identificados a partir de la biblioteca SSH se agruparon en la categoría de estrés oxidativo, los cuales codificaban para proteínas detoxificadoras de ROS. Aparentemente estos genes son muy bien regulados por la planta para lograr en un primer momento de la infección altos niveles de ROS. La regulación negativa observada para varios de estos genes como (*Cat*, *Mt* y *Apx*) podría estar asegurando el arresto inicial del crecimiento de *M. fijiensis*. Un segundo momento ocurre cuando se incrementa la expresión relativa de los transcritos de genes que codifican para proteínas detoxificadoras de ROS, garantizando que ocurra el menor daño posible a la célula de 'Calcutta 4'. Al incremento de los niveles de ROS podría contribuir también la producción de poliaminas a partir de la sobreexpresión del gen *Sams* en el cultivar resistente, aunque se conoce que la acción de esta enzima puede de igual modo conducir a la síntesis de etileno o al ciclo de la metionina en el citoplasma. Los altos niveles de ROS asegurados en 'Calcutta 4' en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, podrían constituir una señal de estrés conducida hasta el núcleo para activar la transcripción del programa de genes necesario para la defensa de la planta.

Otra enzima con función en el metabolismo es la FAH, involucrada en el catabolismo de la tirosina. La incorporación al ciclo de Krebs de los esqueletos carbonados

procedentes de este aminoácido puede ayudar a compensar las demandas energéticas durante la defensa.

En la interacción 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* otros genes también podrían estar involucrados directamente en la regulación de la defensa. La ubiquitina ligasa E2, además de su función en la degradación de proteínas, se ha descrito que posee actividad reguladora de la inmunidad en plantas (Mural *et al.*, 2013). Por otra parte, la hidrolasa de pared es considerada un elemento importante en la defensa de las plantas, por su probable capacidad hidrolítica sobre las estructuras del hongo y la permeasa de aminoácido pudiera contribuir con la homeostasis de aminoácidos durante la defensa.

Entre las ESTs que codifican para el tráfico intracelular y la transducción de señales fue encontrada una GTPasa y un receptor vacuolar. Las GTPasas están involucradas en el tráfico de membrana, funciones reguladoras dentro de la célula y puede mediar el transporte de vesículas permitiendo la internalización de determinadas moléculas, incluidos productos de genes de avirulencia del patógeno y ser estos reconocidos ulteriormente en determinados compartimentos celulares.

La presencia de un receptor vacuolar durante la respuesta de las plantas resistentes a la infección por *M. fijiensis*, resulta de gran interés teniendo en cuenta que la vacuola contiene enzimas hidrolíticas que durante la muerte celular programada conllevan a su colapso, liberando así estas enzimas. La ruptura de este organelo mediado por este receptor, podría ser una característica de la respuesta similar a la hipersensible planteada para el cv. 'Calcutta 4'.

De las ESTs encontradas resulta interesante la TrbL, ya que la homología de esta secuencia es con un gen de *Afipia* sp. Este organismo pertenece a un género de bacterias capaces de establecer simbiosis y pudiera ser parte del arsenal de efectores del hongo expresado *in planta*.

Otros genes del metabolismo secundario estudiados fueron los relacionados con la ruta de los fenilpropanoides, que aunque no fueron encontrados en la biblioteca SSH realizada en la interacción incompatible, si se demostró su inducción temprana en plantas de 'Calcutta 4' con respecto al cv. susceptible 'Grande naine', demostrándose así la posible contribución de esta ruta de síntesis de compuestos fenólicos a la resistencia en estas plantas.

A un grupo importante de ESTs de la biblioteca SSH no fue posible asignarle función biológica alguna, en ellas podría encontrarse información sobre genes muy específicos de esta interacción, que bien vale continuar su identificación con la ayuda de herramientas bioinformáticas.

En la investigación realizada, los resultados alcanzados con el estudio del patosistema *M. acuminata*-*M. fijiensis*, representan una contribución al conocimiento y entendimiento de esta interacción. La identificación de genes y rutas metabólicas activadas durante la respuesta de defensa del cv. 'Calcutta 4' en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis* además de, la información colectada de los perfiles de expresión de genes obtenidos tanto para la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* como para la compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis*, aportan nuevos elementos a la caracterización molecular del patosistema.

5. CONCLUSIONES

1. Mediante la construcción de una biblioteca de ADNc sustractiva por supresión, fue posible identificar ESTs expresadas diferencialmente en plantas del cv. resistente 'Calcutta 4' en un estadio temprano de la interacción con *M. fijiensis*, los cuales se agruparon en las categorías funcionales: fotosíntesis y energía, estrés oxidativo, metabolismo primario, metabolismo secundario, mantenimiento celular, transporte, elementos transponibles, defensa, destino de proteínas, transducción de señales y tráfico intracelular, no clasificadas y sin homología.

2. En la interacción 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* se demostró la activación de los genes relacionados con el metabolismo *PsI* y *Sams* y de los genes relacionados con el estrés oxidativo *Mt* y *Trx*. Los cambios en la expresión de los genes relacionados con este proceso redox en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, aseguraron la presencia de niveles de ROS para desencadenar una respuesta de defensa efectiva, lo cual se corroboró con la máxima acumulación de O_2^- y el aumento de la actividad peroxidasa obtenida durante la interacción incompatible. Sin embargo, en la interacción compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis* la inhibición de los genes del metabolismo y la activación del gen relacionado con el estrés oxidativo *Trx*, al parecer no logran asegurar la resistencia a *M. fijiensis* en el período estudiado de la interacción.

3. Fue posible constatar diferencias en los niveles máximos de expresión y del tiempo en que esto ocurre, para los genes pertenecientes a la ruta de los fenilpropanoides *C4h*, *Chs* e *Irl*, en plantas del cv. resistente 'Calcutta 4' con respecto al susceptible 'Grande naine', en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*. La mayor magnitud de la respuesta observada en 'Calcutta 4' podría sugerir el papel de la ruta en la respuesta defensiva en bananos.

4. En plantas de 'Calcutta 4' se comprobó la expresión diferencial de ESTs involucradas en varias rutas metabólicas, a partir de una biblioteca SSH creada en este cultivar en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*. Los análisis de expresión para las ESTs de la biblioteca SSH seleccionadas relacionadas con el metabolismo, el estrés oxidativo y de otras ESTs derivadas de la ruta de los fenilpropanoides, tanto en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* así como, en la compatible 'Grande naine'-*M. fijiensis*, contribuyeron a un mejor entendimiento de la respuesta de las plantas ante la infección por este patógeno.

6. RECOMENDACIONES

1. Realizar análisis moleculares en la interacción 'Calcutta 4'-*M. fijiensis* a través de los ensayos cuantitativos de expresión, teniendo en cuenta genes no estudiados en el presente documento como la hidrolasa de pared, las GTPasas.
2. Realizar estudios funcionales con el gen de la tioredoxina por su importancia en la interacción planta-patógeno.
3. Cuantificar los niveles de metabolitos secundarios producidos a partir de los genes estudiados derivados de la ruta de los fenilpropanoides.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadie C, El Hadrami A, Fouré E y Carlier J. (2003) Efficiency and durability of partial resistance against black leaf streak disease, in: Jacome L, *et al.* (Eds.), *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases, INIBAP, San José, Costa Rica. pp. 161-168.

Able A J, Guest D I y Sutherland M W (2000) Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae*. Plant Physiology 124: 899-910.

Agrios G N. (2005) Plant Pathology 5th edition Elsevier Academic Press.

Alexopoulos C J y Mims C W. (1979) Introductory Mycology 3rd edition John Wiley & Sons, Wiley, New York, USA.

Almagro L, Gómez Ros L V, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A y Pedreño M A (2008) Class III peroxidases in plant defence reactions. Journal of Experimental Botany 60: 377-390.

Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman D J (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389-3402.

Alvarado-Capó Y, Leiva M, Dita Rodríguez M A, Acosta M, Cruz M, Portal N, Gómez R, García L R, Bermúdez I y Padrón Y. (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*, in: Jacome L, *et al.* (Eds.), *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases, INIBAP, San José, Costa Rica. pp. 169-175.

- Anonymous. (2010) Black sigatoka, banana-Saint Lucia: first report archive No. 20100204.0381, ProMed-Mail, International Society for Infectious Diseases. disponible en <http://www.promedmail.org> (consulta agosto de 2013).
- Apel K y Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Argent G C G (1976) The wild bananas of Papua New Guinea. *Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh* 35: 77-114.
- Austin M J, Muskett P, Kahn K, Feys B J, Jones J D G y Parker J E (2002) Regulatory role of *SGT1* in early R gene-mediated plant defenses. *Science* 295: 2077-2080.
- Azhar M y Heslop-Harrison J S (2008) Genomes, diversity and resistance gene analogues in *Musa* species. *Cytogenetic and Genome Research* 121: 59-66.
- Baker J G (1893) A synopsis of the genera and species of *Museae*. *Annals of Botany* 7: 189-229.
- Becker D K, Dugdale B, Smith M K, Harding R M y Dale J L (2000) Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv Gran Nain via microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports* 19: 229-234.
- Bechtold U, Karpinski S y Mullineaux P M (2005) The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant-biotrophic pathogen interactions. *Plant, Cell and Environment* 28: 1046-1055.
- Beltrán-García M J, Manzo-Sánchez G, Guzmán-González S, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola M, Avila-Miranda M y Ogura T (2009) Oxidative stress response of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease in banana plants, to hydrogen peroxide and paraquat. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 887-894.

- Bennett R S y Arneson P A. (2003) Black sigatoka. The Plant Health Instructor. disponible en <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/BlackSigatoka> (consulta agosto de 2013).
- Bennetzen J L (2000) Transposable element contributions to plant genome evolution. *Plant Molecular Biology* 42: 251-269.
- Berger S n, Benediktyova Z, Matous K, Bonfig K, Mueller M J, Nedbal L y Roitsch T (2007) Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Biology* 58 (4): 797-806.
- Bhuiyan N H, Liu W, Liu G, Selvaraj G, Wei Y y King J (2007) Transcriptional regulation of genes involved in the pathways of biosynthesis and supply of methyl units in response to powdery mildew attack and abiotic stresses in wheat. *Plant Molecular Biology* 64: 305-318.
- Bilgin D D, Zavala J A, Zhu J, Clough S J, Ort D R y DeLucia E H (2010) Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. *Plant Cell and Environment* 33: 1597-1613.
- Böhlenius H, Mørch S M, Godfrey D, Nielsen M E y Thordal-Christensen H (2010) The multivesicular body-localized GTPase ARFA1b/1c is important for callose deposition and ROR2 syntaxin-dependent preinvasive basal defense in barley. *The Plant Cell* 22: 3831-3844.
- Boller T y Felix G A (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.

- Burt A. (2003) Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*, in: Jacome L, *et al.* (Eds.), *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease, INIBAP, San José, Costa Rica. pp. 111-121.
- Cakmak I, Strbac D y Marschner H (1993) Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany* 44: 127-132.
- Campo S, Manrique S, García-Martínez J y San Segundo B (2008) Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnology Journal* 6: 585-608.
- Carlier J, De Waele D y Escalant J-V. (2003) Global evaluation of *Musa* germplasm for resistance to *Fusarium* wilt, *Mycosphaerella* leaf spot diseases and nematodes, in: Vézina A y Picq C (Eds.), INIBAP Technical Guidelines 7. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.
- Carpentier S C, Coemans B, Podevin N, Laukens K, Witters E, Matsumura H, Terauchi R, Swennen R y Panis B (2008) Functional genomics in a non-model crop: transcriptomics or proteomics? *Physiologia Plantarum* 133: 117-130.
- Cavalcante M d J B, Escoute J, Madeira J P, Romero R E, 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.
- Clark D, Durner J, Navarre D A y Klessig D F (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13: 1380-1384.
- Craenen K y Ortiz R (1996) Effect of the black sigatoka resistance locus *bs1* and ploidy level on fruit and bunch traits of plantain-banana hybrids. *Euphytica* 87: 97-101.

- Craenen K y Ortiz R (1997) Effect of the *bsl* gene in plantain-banana hybrids on response to black sigatoka. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 497-505.
- Cruz-Cruz C A, García-Sosa K, Escalante-Erosa F y Peña-Rodríguez L M (2009) Production of hydrophilic phytotoxins by *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of General Plant Pathology* 75: 191-195.
- Cruz-Cruz C A, García-Sosa K, Escalante-Erosa F y Peña-Rodríguez L M (2011) Physiological effects of the hydrophilic phytotoxins produced by *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black sigatoka in banana plants. *Journal of General Plant Pathology* 77: 93-100.
- Cruz M, Alvarado Y, Acosta M, Leiva M y Roque B (2004) Caracterización de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet para su utilización en programas de mejoramiento de *Musa* spp. *Biotecnología Vegetal* 4: 111-114.
- Cheesman E E (1947) Classification of the bananas: The genus *Musa* L. *Kew Bulletin* 2: 106-117.
- D'Hont A, Paget-Goy A, Escoute J y Carreel F (2000) The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 177-183.
- D'Hont A, Denoeud F, Jean-MarcAury, Baurens F-C, Carreel F, Garsmeur O, Noel B, Bocs S, Droc G, Rouard M, Silva C D, Jabbari K, Cardi C, Poulain J, Souquet M, Labadie K, Jourda C, Lengellé J, Rodier-Goud M, Alberti A, Bernard M, Correa M, Ayyampalayam S, Mckain M R, Leebens-Mack J, Burgess D, Freeling M, Mbéguié-A-Mbéguié D, Chabannes M, Wicker T, Panaud O, Barbosa J, Hribova E, Heslop-Harrison P, Habas R, Rivallan R, Francois P, Poiron C, Kilian A, Burthia D, Jenny C, Bakry F, Brown S, Guignon V, Kema G, Dita M, Waalwijk C, Joseph S, Dievart A,

- Jaillon O, Leclercq J, Argout X, Lyons E, Almeida A, Jeridi M, Dolezel J, Roux N, Risterucci A-M, Weissenbach J, Ruiz M, Glaszmann J-C, Quétier F, Yahiaoui N y Wincker P (2012) The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488: 213-217.
- Dauch A L y Jabaji-Hare S H (2006) Metallothionein and bZIP transcription factor genes from velvetleaf and their differential expression following *Colletotrichum coccodes* infection. *Phytopathology* 96: 1116-1123.
- Diatchenko L, Chris Lau Y-F, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N G, Sverdlov E D y Siebert P D (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU.* 93: 6025-6030.
- Dixon D P y Edwards R (2006) Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 171: 360-366.
- Dixon R A, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Srinivasa Reddy M S y Wang L (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.
- Doke N (1983) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological and Plant Pathology* 23: 345-357.
- Echeverri F, Torres F, Quiñones W, Escobar G y Archbold R (2012) Phenylphenalenone phytoalexins, will they be a new type of fungicide? 11: 1-12.

- Edgecomb D W y Manker D (2005) *Bacillus subtilis* strain QST713, bacterial disease control fruit, vegetable and ornamental production. Proceedings of the 1st International Symposium on biological control of bacterial. Plant Diseases 408: 167-169.
- El Hadrami A, Kone D y Lepoivre P (2005) Effect of juglone on active oxygen species and antioxidant enzymes in susceptible and partially resistant banana cultivars to black leaf streak disease. European Journal of Plant Pathology 113: 241-254.
- Emediato F L, Nunes F A C, de Camargo Teixeira C, Passos M A N, Bertoli D J, Pappas Jr G J y Miller R N G. (2009) Characterization of resistance gene analogs in *Musa acuminata* cultivars contrasting in resistance to biotic stresses, Rome, pp. 443-445.
- Entus R, Poling M y Herrmann K M (2002) Redox regulation of *Arabidopsis* 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase. Plant Physiology 129: 1866-1871.
- FAOSTAT. (2011) Food and Agriculture Organization of the United Nations, disponible en <http://faostat.fao.org> (consulta agosto de 2013).
- FHIA (2007) Bananos y plátanos de la FHIA para la seguridad alimentaria. FHIA informa 15: 6-8.
- Flor H H (1971) Current status of the gene-for-gene concept. Annual Review of Phytopathology 9: 275-296.
- Fofana B, Benhamou N, McNally D J, Labbé C, Séguin A y Bélanger R R (2005) Suppression of induced resistance in cucumber through disruption of the flavonoid pathway. Phytopathology 95: 114-123.
- Fouré E (1985) Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains á *Mycosphaerella*

fijiensis Morelet au Gabon (maladie des raies noires). (suite III). Fruits 40 (6): 393-399.

Foyer C H y Noctor G (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. Antioxidants & Redox Signaling 11: 861-905.

Frossard P (1980) Apparition d'une nouvelle et grave maladie foliaire des bananiers et plantains au Gabon: la maladie des raies noires *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Fruits 35: 519-527.

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 Horticultural Science 23: 39-48.

Gechev T S, Minkov I N y Hille J (2005) Hydrogen peroxide-induced cell death in *Arabidopsis*: transcriptional and mutant analysis reveals a role of an oxoglutarate-dependent dioxygenase gene in the cell death process. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life 57: 181-188.

Gu Y-Q, Wildermuth M C, Chakravarthy S, Loh Y T y Yang C (2002) Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. Plant Cell 14: 817-831.

Gupta S M, Srivastava S, Sane A P y Nath P (2006) Differential expression of genes during banana fruit development, ripening and 1-MCP treatment: Presence of distinct fruit specific, ethylene induced and ethylene expression. Postharvest Biology and Technology 42: 16-22.

Hammerschmidt R, Nuckles E M y Kuc J (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiological and Plant Pathology 20: 73-82.

- Hassinen V H, Tervahauta A I, Schat H y Kärenlampi S O (2011) Plant metallothioneins–metal chelators with ROS activity? *Plant Biology* 13: 225-232.
- Hayward A C (2006) Pudrición de las frutas de banano causada por *Ralstonia solanacearum* raza 2: materias de nomenclatura, transmisión y control. *InfoMusa* 15: 7-10.
- Hidalgo M, Tapia A C, Rodríguez W y Serrano E (2006) Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* spp. AAA, cv. Valery). *Agronomía Costarricense* 30: 35-41.
- 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.
- 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 pathosystems (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopathology* 148: 387-394.
- Huang X y Madan A (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868-877.
- Hunt E, Gattolin S, Newbury H J, Bale J S, Tseng H-M, Barrett D A y Pritchard J (2010) A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the *Arabidopsis* sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *Journal of Experimental Botany* 61: 55-64.
- Irish B M, Goenaga R y Ploetz R C (2006) *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black sigatoka of *Musa* spp. found in Puerto Rico and identified by polymerase chain reaction. *Plant Disease* 90: 684.

- Iwai T, Miyasaka A, Seo S y Ohashi Y (2006) Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiology* 142: 1202-1215.
- Jacome L H. (2003) Population biology and epidemiology, in: Jacome L, *et al.* (Eds.), *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases, INIBAP, San José, Costa Rica. pp. 107-110.
- Jones D R. (2000) Diseases of banana Abacá and Enset. CAB International, Wallingford, Oxford, UK. pp. 48-71.
- Jones D R. (2003) The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana, in: Jacome L, *et al.* (Eds.), *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases INIBAP, San José, Costa Rica. pp. 25-41.
- Jones J D G y Dangl J L (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kangasjarvi S, Neukermans J, Li S, Aro E-M y Noctor G (2012) Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. *Journal of Experimental Botany* 63 (4): 1619-1636.
- Kiggundu A, Pillay M, Viljoen A, Gold C, Tushemereirwe W K y Kunert K J (2003) Enhancing banana weevil (*Cosmopolites sordidus*) resistance by plant genetic modification: A perspective. *African Journal of Biotechnology* 2: 563-569.
- Kim S G, Kim S T, Wang Y, Kim S-K, Lee C H, Kim K-K, King J-K, Lee S Y y Kang K Y (2010) Overexpression of rice isoflavone reductase-like gene (*OsIRL*) confers tolerance to reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* 138: 1-9.

- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S y Geigenberger P (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU.* 102: 11118-11123.
- Kottapalli K R, Rakwal R, Satoh K, Shibato J, Kottapalli P, Iwahashi H y Kikuchi S (2007) Transcriptional profiling of indica rice cultivar IET8585 (Ajaya) infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae pv oryzae*. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 834-850.
- Kovács G, Sági L, Jacon G, Arinaitwe G, Busogoro J-P, Thiry E, Strosse H, Swennen R y Remy S (2012) Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease. *Transgenic Research* 22: 117-130.
- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y y Reichheld J-P (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its w-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology* 134: 1006-1016.
- Legay G, Marouf E, Berger D, Neuhaus J-M, Mauch-Mani B y Slaughter A (2011) Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). *European Journal of Plant Pathology* 129: 281-301.
- 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 (2): 79-88.

- Lemaire S D, Michelet L, Za-Vagnini M, Massot V y Issakidis-Bourguet E (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genetics* 51: 343-365.
- Lepoivre P, Busogoro J-P, Etame J-J, El Hadrami A, Carlier J, Harelimana G, Mourichon X, Panis B, Riveros A S, Sallé G, Strosse H y Swennen R. (2003) Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions, in: Jacome L, *et al.* (Eds.), *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease, INIBAP, San José, Costa Rica. pp. 151-159.
- Lescot M, Piffanelli P, Ciampi A Y, Ruiz M, Blanc G, Leebens-Mack J, da Silva F R, Santos C M R, D'Hont A, Garsmeur O, Vilarinhos A D, Kanamori H, Matsumoto T, Ronning C M, Cheung F, Haas B J, Althoff R, Arbogast T, Hine E, Pappas Jr G J, Sasaki T, Souza Jr M T, Miller R N G, Glaszmann J-C y Town C D (2008) Insights into the *Musa* genome: Syntenic relationships to rice and between *Musa* species. *BMC Genomics* 9: 58.
- Less H y Galili G (2008) Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. *Plant Physiology* 147: 316-330.
- Liao Z, Chen M, Gong Y, Tang F, Sun X y Tang K (2004) Rapid isolation of high quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 34: 209-214.
- Livak K J y Schmittgen T D (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method. *Methods* 25: 402-408.
- Long P G (1979) Banana black streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*) in Western Samoa. *Transactions of the British Mycological Society* 49: 299-310.

- Marín D H, Romero R A, Guzmán M y Sutton T B (2003) Black sigatoka: an increasing treath to banana cultivation. *Plant Disease* 87: 208-222.
- Martí M C, Florez-Sarasa I, Camejo D, Ribas-Carbó M, Lázaro J J, Sevilla F y Jiménez A (2011) Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany* 62: 3863-3874.
- Martin G B, Bogdanove A J y Sessa G (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23-61.
- Martínez G (1997) The present situation with regard to black sigatoka in Venezuela. *InfoMusa* 6: 16-17.
- Meredith D S y Lawrence J S (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of the disease in Hawaii and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society* 52: 459-476.
- Meredith D S y Lawrence J S (1970) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Susceptibility of cultivars. *Tropical Agriculture* 47: 375-387.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F y Noctor G (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* 61: 4197-4220.
- Miller R N G, Bertioli D J, Baurens F-C, Santos C M R, Alves P C, Martins N F, Togawa R C, Souza Jr M T y Pappas Jr G J (2008) Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biology* 8: 15.

- Mittler R, Hallak Herr E, Larus Orvar B, van Camp W, Willekens H, Inzé D y Ellis B E (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU.* 96: 14165-14170
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel W H, Hurkman W J y Buchanan B B (2009) Thioredoxin targets in plants: The first 30 years. *Journal of Proteomics* 72: 452-474.
- Moschou P N, Sarris P F, Skandalis N, Andriopoulou A H, Paschalidis K A, Panopoulos N J y Roubelakis-Angelakis K A (2009) Engineered polyamine catabolism preinduces tolerance of tobacco to bacteria and oomycetes. *Plant Physiology* 149: 1970-1981.
- Mourichon X y Fullerton R A (1990) Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of sigatoka disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. *Fruits* 45: 213-218.
- Muller P Y, Janovjak H, Miserez A R y Dobbie Z (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32: 2-7.
- Mural R V, Liu Y, Rosebrock T R, Brady J J, Hamera S, Connor R A, Martin G B y Zeng L (2013) The tomato Fni3 Lysine-63-specific ubiquitin-conjugating enzyme and suv ubiquitin E2 variant positively regulate plant immunity. *The Plant Cell*. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113> (consulta 7 octubre de 2013).
- Murgia I, Tarantino D, Vannini C, Bracale M, Carravieri S y Soave C (2004) *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show

increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *The Plant Journal* 38: 940-953.

Nielsen E, Cheung A Y y Ueda T (2008) The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking. *Plant Physiology* 147: 1516-1526.

Nishiyama Y, Allakhverdiev S I y Murata N (2011) Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiologia Plantarum* 142: 35-46.

Oksanen E, Haikkio E, Sober J y Karnosky D F (2003) Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. *New Phytologist* 161: 791-799.

Oloriz M I, Gil V, Rojas L, Portal O, Izquierdo Y, Jiménez E y Höfte M (2012) Sugarcane genes differentially expressed in response to *Puccinia melanocephala* infection: identification and transcript profiling. *Plant Cell Reports* 31: 955-969.

Ortiz-Vázquez E, Kaemmer D, Zhang H-B, Muth J, Rodríguez-Mendiola M, Arias-Castro C y James A (2005) Construction and characterization of a plant transformation-competent BIBAC library of the black sigatoka-resistant banana *Musa acuminata* cv. Tuu Gia (AA). *Theoretical and Applied Genetics* 110: 706-713.

Ortiz R y Vuylsteke D R (1994) Inheritance of black sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa* spp.) hybrids. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 146-152.

Otálvaro F, Echeverri F, Quiñones W, Torres F y Schneider B (2002a) Correlation between phenylphenalenone phytoalexins and phytopathological properties in *Musa* and the role of a dihydrophenylphenalene triol. *Molecules* 7: 331-340.

- Otálvaro F, Görls H, Hölscher D, Schmitt B, Echeverri F, Quiñones W y Schneider B (2002b) Dimeric phenylphenalenones from *Musa acuminata* and various Haemodoraceae species. Crystal structure of anigorootin. *Phytochemistry* 60: 61-66.
- Otálvaro F, Nanclares J, Vásquez L E, Quiñones W, Echeverri F, Arango R y Schneider B (2007) Phenalenone-type compounds from *Musa acuminata* var. 'Yangambi km 5' (AAA) and their activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Natural Products* 70: 887-890.
- Passos M A N, de Oliveira Cruz V, Emediato F L, de Camargo Teixeira C, Souza M T J, Matsumoto T, Rennó Azevedo V C, Ferreira C F, Amorim E P, de Alencar Figueiredo L F, Martins N F, de Jesus Barbosa Cavalcante M, Baurens F-C, da Silva O B J, Pappas G J J, Pignolet L, Abadie C, Ciampi A Y, Piffanelli P y Miller R N G (2012) Development of expressed sequence tag and expressed sequence tag-simple sequence repeat marker resources for *Musa acuminata*. *AoB PLANTS*: pls030.
- Patykowski J y Urbanek H (2003) Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* 151: 153-161.
- Pérez-Hernández J B. (2000) Development and application of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to increase fungus-resistance in banana (*Musa* spp.), Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. pp. 187.
- Pérez-Hernández J B, Swennen R y Sági L (2006) Number and accuracy of T-DNA insertions in transgenic banana (*Musa* spp.) plants characterized by an improved anchored PCR technique. *Transgenic Research* 15: 139-150.
- Pérez L, Alvarez J M y Pérez M. (2003) Economic impact and management of black leaf streak disease in Cuba, in: Jacome L, *et al.* (Eds.), *Mycosphaerella* leaf spot

- diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases, INIBAP, San José, Costa Rica. pp. 71-84.
- Peterson F C, Lytle B L, Sampath S, Vinarov D, Tyler E, Shahan M, Markley J L y Volkman B F (2005) Solution structure of thioredoxin *h1* from *Arabidopsis thaliana*. Protein Science 14: 2195-2200.
- Petrov V D y Van Breusegem F (2012) Hydrogen peroxide—a central hub for information flow in plant cells. AoB PLANTS: pls014.
- Pickart C M (2001) Ubiquitin enters the new millennium. Molecular Cell 8: 499-504.
- Ploetz R (1994) Panama disease: Return of the first banana menace. International Journal of Pest Management 40: 326-336.
- Ploetz R C (1999) First report of black sigatoka in Florida. Plant Disease 83: 300.
- Ploetz R C (2004a) First report of black sigatoka of banana caused by *Mycosphaerella fijiensis* on Grand Bahama island. Plant Disease 88: 772.
- Ploetz R C (2004b) Enfermedades y plagas: Un análisis de su importancia y manejo. InfoMusa 13: 11-16.
- Portal O, Izquierdo Y, Vleeschauwer D D, Sánchez-Rodríguez A, Mendoza-Rodríguez M, Acosta-Suárez M, Ocaña B, Jiménez E y Höfte M (2011) Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*-banana interaction. Plant Cell Reports 30: 913-928.
- Pulseglove J. (1972) Tropical crops, Monocotyledons. UK. Longman Group limited, pp. 368-369.

- Raemaekers R (1975) Black leaf streak-like disease in Zambia. PNAS 21: 369-400.
- Rhodes P (1964) A new banana disease in Fiji. Commonwealth Phytopathological News 10: 38-41.
- Rivas S y Thomas C M (2005) Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. Annual Review of Phytopathology 43: 395-436.
- Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schauser L, Yoshioka H y Jones J D G (2004) CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. EMBO Journal 23: 2156-2165.
- Riveros A S, Giraldo C I y Gamboa A. (2003) Microbiological control of black leaf streak disease, in: Jacome L, *et al.* (Eds.), *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases, INIBAP, San José, Costa Rica. pp. 287-296.
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr J E, Rodermel S, Inzé D y Mittler R (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. The Plant Journal 32: 329-342.
- Romero D, Rivera M E, Cazorla F M, Codina J C, Fernández-Ortuño D, Torés J A, Pérez-García A y de Vicente A (2008) Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement in compatible and incompatible melon–powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interaction. Journal of Plant Physiology 165: 1895-1905.
- Romero R A y Sutton T B (1997) Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black sigatoka of banana, to propiconazole. Phytopathology 87: 96-100.

- Rose J K C, Ham K-S, Wu S-C, Darvill A G y Albersheim P (2000) Cell wall hydrolases and their inhibitor. SAAS Bulletin: Biochemistry and Biotechnology 13: 55-62.
- Roux N, Baurens F-C, Dolezel J, Hribová E, Heslop-Harrison P, Town C, Sasaki T, Matsumoto T, Aert R, Remy S, Souza M y Lagoda P J L. (2008) Genomics of banana and plantain (*Musa* spp.), major staple crops in the tropics Springer, New York, pp. 83-111.
- Rozen S y Skaletsky H. (2000) Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Šafár J, Noa-Carranza J C, Vrána J, Bartoš J, Alkhimova O, Sabau X, Šimková H, Lheureux F, Caruana M-L, Dolezel J y Piffanelli P (2004) Creation of a BAC resource to study the structure and evolution of the banana (*Musa balbisiana*) genome. Genome 47: 1182-1191.
- Sagi L, Remy S, Panis B, Swennen R y Volckaert G (1994) Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., Bluggoe', AAB group) protoplast isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. Plant Cell Reports 13: 262-266.
- Sambrook J y Russell W R. (2001) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, New York.
- Sánchez-García C. (2010) Determinación de compuestos bioquímicos y su relación con la respuesta de plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*, en casa de cultivo, Tesis en opción al título Académico de Master en Biotecnología Vegetal, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara. pp. 103.

- Sánchez-Rodríguez A, Portal O, Rojas L E, Ocaña B, Mendoza M F, Acosta M, Jiménez E y Hofte M (2008) An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis-Musa* spp. interaction. *Molecular Biotechnology* 40: 299-305.
- Sandoval J A y Muller L (1999) Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa* AAA). *Corbana* 24: 43-60.
- Santos C M R, Martins N F, Hörberg H M, de Almeida E R P, Coelho M C F, Togawa R C, Rodrigues da Silva F, Caetano A R, Miller R N G y Souza Jr M T (2005) Analysis of expressed sequence tags from *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*, var. Calcutta 4 (AA) leaves submitted to temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 1517-1522.
- Sebasigari K y Stover R H. (1988) Banana diseases and pests in East Africa. Report of a survey in November 1987, INIBAP. pp. 15.
- Sewalt V J H, Ni W, Blount J W, Jung H C, Masoud S A, Howles P A, Lamb C J y Dixon R A (1997) Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. *Plant Physiology* 115: 41-50.
- Shetty N P, Jørgensen H J L, Due J, Collinge D B y Shekar H (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 121: 267-280.
- Shetty N P, Kristensen B K, Newman M-A, Møllera K, Gregersen P L y Jørgensen H J L (2003) Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 333-346.

- Shetty N P, Mehrabi R, Lütken H, Haldrup A, Kema G H J, Collinge D B y Jørgensen H J L (2007) Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist* 174: 637-647.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y y Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305-1319.
- Simmonds N W. (1962) The evolution of the bananas, En: Inc J W S (Ed.), New York, pp. 170.
- Smalle J y Vierstra R D (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology* 55: 555-590.
- Sreeramanan S, Maziah M, Rosli N M, Sariah M y Xavier R (2006) Particle bombardment-mediated co-transformation of chitinase and β -1, 3 glucanase genes in banana. *Biotechnology* 5 (2): 203-216.
- Stergiopoulos I, van den Burg H A, Ökmen B, Beenen H G, van Liere S, Kema G H J y de Wit P J G M (2010) Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU.* 107 (16): 7610-7615.
- Stover R H (1980) Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. *Plant Disease* 64 (8): 750-758.
- Stover R H y Simmonds N W. (1987) *Bananas* 3rd edition. Longmans Scientific and Technical, Harlow, UK.
- Strosse H, Van den Houwe I y Panis B. (2004) *Banana cell and tissue culture-review* Science Publishers, UK, pp. 1-12.

- Swennen R y Vuylsteke D R (1993) Breeding black sigatoka resistant plantains with a wild banana. *Tropical Agriculture Trinidad* 70: 74-77.
- Tada Y, Spoel S H, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J y Dong X (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952-956.
- 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. *European Journal of Plant Pathology* 133: 887-898.
- Torres M A (2010) ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138: 414-429.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A y Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3: research0034.
- Vidal A (1992) Sigatoka negra en Cuba. En nuevos focos de plagas y enfermedades. *Boletín Fitosanitario de la FAO* 40: 1-2.
- Vilarinhos A D, Piffanelli P, Lagoda P J L, Thibivilliers S, Sabau X, Carreel F y D'Hont A (2003) Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of banana (*Musa acuminata* Colla). *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1102-1106.
- Vishnevetsky J, Jr T L W, Palmateer A J, Flaishman M, Cohen Y, Velcheva Y E, Hanania U, Sahar N, Dgani O y Perl A (2010) Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. *Transgenic Research* 20: 61-72.
- Vuylsteke D R, Swennen R y Ortiz R (1993) Development and performance of black sigatoka-resistant tetraploid hybrids of plantain (*Musa* spp., AAB group). *Euphytica* 65: 33-42.

- Walters D R (2003) Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. *New Phytologist* 159: 109-115.
- Walters D R, McRoberts N y Fitt B D L (2008) Are green islands red herrings? Significance of green islands in plant interactions with pathogens and pests. *Biological Reviews* 83: 79-102.
- Whisson S, Boevink P, Moleleki L, Avrova A, Morales J, Gilroy E M y Armstrong M (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450: 115-118.
- Wolfsberg T G. (2001) Expressed sequence tags (ESTs), in: Baxevanis A D y Ouellette B F F (Eds.), *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*, John Wiley and Sons, Inc.
- Wong H L, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K y Shimamoto K (2004) Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology* 135: 1447-1456.
- Xu B Y, Su W, Liu J H, Wang J B y Jin Z (2007) Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Planta* 226 (2): 529-539.
- Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, Takeda T, Ishikawa T y Shigeoka S (2002) Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *The Plant Journal* 32: 915-925.
- Zabala G, Zou J, Tuteja J, Gonzalez D O, Clough S J y Vodkin L O (2006) Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. *BMC Plant Biology* 6: 1-45.

8. ANEXOS

Anexo 1. Purificación de ARN total de plantas

Se procedió según el protocolo descrito por Liao *et al.* (2004). Se pesó 1 g de hoja de la planta y se maceró en nitrógeno líquido hasta formar una pasta fina. El material fue transferido a un tubo de 50 mL que contenía 20 mL del tampón de extracción previamente calentado a 65°C (CTAB 3% (m/v), PVP 3% (m/v) PM 40 000, EDTA 25mM, NaCl 2,0 M, Tris-HCl 100 mM pH 8,0, spermidine 0,5 g L⁻¹), se colocó en el vortex por 30 s y se incubó a 65°C durante 10 min, cuyo contenido fue mezclado ocasionalmente. Un volumen de cloroformo e isoamil alcohol (24:1) (v/v) fue añadido a la mezcla, la cual se mezcló suavemente por 10 min y se centrifugó a 12 000 g a 10°C por 10 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y extraído nuevamente con un volumen de cloroformo e isoamil alcohol (24:1) (v/v) por 10 min y posteriormente centrifugado a 12 000 g a 10°C por 10 min. Este paso fue repetido una vez más y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo que contenía ¼ del volumen de LiCl 10 M. El contenido del tubo fue mezclado, se conservó a 4°C toda la noche y se centrifugó a 12 000 g a 4°C por 30 min. El precipitado obtenido se resuspendió suavemente en 500 µL de SDS 0,5%, fue extraído con cloroformo e isoamil alcohol (24:1) (v/v) y centrifugado a 12 000 g a 4°C por 10 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, se le añadió 2 mL de etanol absoluto, se mezcló vigorosamente y se dejó precipitar a -20 °C por 2 h. El ARN fue colectado por precipitación a 12 000 g a 4°C por 30 min, lavado con etanol al 75% dos veces, secado al vacío, resuspendido en 200 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato y conservado a -80 °C hasta su utilización.

Anexo 2. Purificación de ARN total a partir del micelio del hongo

Se procedió según el protocolo descrito por Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008). Se pesó 1 g del micelio del hongo liofilizado y se maceró en nitrógeno líquido. Se añadieron 20 mL del tampón *CleanUp* (Tris HCl 100 mM pH 8,0, sorbitol 0,35 M, PEG 6 000 10% (m/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v)) y se colocó en el vortex por 30 s, posteriormente se realizó la centrifugación por 10 min a 8 000 g a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 10 mL del tampón de extracción (NaCl 0,6 M, EDTA 10 mM, Tris HCl 100 mM pH 8,0, SDS 4%, β -mercaptoetanol al 2% (v/v)), previamente calentado a 65°C y se incubó a esta temperatura por 10 min, cuyo contenido fue mezclado ocasionalmente. La muestra se enfrió a temperatura ambiente y se le adicionó 1 mL de acetato de potasio 5 M, 3 mL de etanol absoluto frío, 10 mL de fenol y 2 mL de cloroformo. Se procedió a agitar vigorosamente hasta formar una emulsión, se incubó por 30 min en hielo y se centrifugó por igual período de tiempo a 4°C a 12 000 g. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se realizó una extracción con un volumen de cloroformo-álcool isoamílico (24:1), agitando suavemente durante 10 min en un balancín. A continuación se procedió a centrifugar a 4°C por 10 min a 12 000 g. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y se realizó una nueva extracción con solvente orgánico, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo, que contenía $\frac{1}{4}$ del volumen total de LiCl 10 M, se mezclaron los componentes y se dejó precipitando el ARN toda la noche a 4°C. La recuperación del ARN se realizó por centrifugación a 4°C por 30 min a 12 000 g. El precipitado se resuspendió suavemente en 500 μ L de SDS al 0,5%, se centrifugó a 4°C por 10 min a 12 000 g y al sobrenadante obtenido se le adicionaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto.

El ARN se precipitó durante 2 h a -80°C , se centrifugó a 4°C por 30 min a 12 000 g, se lavó el precipitado con etanol al 75%, se secó durante 10 min y se resuspendió en 100 μL de agua libre de ribonucleasa.

Anexo 3. Genes seleccionados de la biblioteca sustractiva por supresión durante la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*Mycosphaerella fijiensis* y cebadores utilizados en el análisis cuantitativo de la expresión.

Gen	Cebador directo 5'→3'	Cebador reverso 5'→3'	Amplicón (pb)
<i>PsI</i>	gagtgtgaaggcaaggacaag	ggcaggtacatagagccatga	106
<i>PsII</i>	gagtccggcaagagtcacacag	gggcaaatgttgatggctac	119
<i>Sams</i>	ctcttcggtcgaggttgatg	gtgtcgtacgcaatcggtgt	151
<i>Cat</i>	aaactacccggagtggaagc	aacgctagctgctcgttctc	200
<i>Mt</i>	agctgtttcccttcttcacg	ttgagccggttgcttggtg	133
<i>Trx</i>	tctcgcacatgtacaccaat	ttcctttaccaccttcccatcc	209
<i>Apx</i>	agcgatcaggatcgttgc	gaaaacaggatcggtgagga	200
<i>Act</i>	ggtagacatcctttctctc	gcatcatctccagcgaac	113

Anexo 4. Genes asociados con la ruta de biosíntesis de compuestos fenilpropanoides según Portal *et al.* (2011).

Gen	Cebador directo 5'→3'	Cebador reverso 5'→3'	Amplicón (pb)
<i>C4h</i>	atgctgggtccgatg	taatcgttctgtgtgcgtg	156
<i>Chs</i>	accaacgcaaaggacaagac	ctccatgtacccgcaccgat	135
<i>Irl</i>	cctccacgccgaaagatg	gcaggtcaatccctctcaac	102
<i>Act</i>	ggtagacatcctttcctctc	gcacatctccagcgaac	113

Anexo 5. Indicadores de la pureza de los ARN totales y ARNm purificados de hojas de plantas del cultivar resistente ‘Calcutta 4’ inoculadas, a diferentes días posteriores a la inoculación con *Mycosphaerella fijiensis*, no inoculadas y del micelio del hongo a los 14 días del cultivo. Muestras: (Ca 0 dpi) de plantas de ‘Calcutta 4’ no inoculadas, (Ca 6, 10, 12 dpi) de plantas de ‘Calcutta 4’ inoculadas y (H) del micelio del hongo.

Muestra	ARN total			ARNm		
	Concentración ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	260/A280	A260/A230	Concentración ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	A260/A280	260/A230
Ca 0 dpi	1,80	1,88	2,12	0,03	1,82	2,10
Ca 6 dpi	1,83	1,86	2,20	0,03	1,94	2,30
Ca 10 dpi	1,85	1,94	2,30	0,02	2,00	2,04
Ca 12 dpi	1,90	1,9	2,16	0,02	1,90	2,15
H 14 días	0,91	2,02	2,10	0,02	1,99	2,20

Anexo 6. Comparación de la posible identidad y características de las secuencias seleccionadas de la biblioteca SSH, expresadas en hojas del cultivar resistente 'Calcutta 4' infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* en un estadio temprano del desarrollo de la enfermedad, con la base de datos del Genbank y con el genoma completo de referencia de *Musa acuminata* var. ('DH-Pahang').

Clon	pb	BlastX: Secuencia de proteína relacionada	Valor E	BlastX: <i>Musa acuminata</i> ('DH Pahang')	Valor E
I. Fotosíntesis y Energía					
Ensamble 7	334	Subunidad N del centro de reacción del fotosistema I	9e-43	Subunidad N del centro de reacción del fotosistema I	1e-37
Ensamble 16	183	NADH deshidrogenasa subunidad β (EC: 1.6.5.3)	1e-26	No homología	
Ca 41	285	Anhidrasa carbónica (EC: 4.2.1.1)	7e-12	Anhidrasa carbónica	7e-17
Ca 43g	261	Posible proteína de cloroplasto de unión a clorofila a-b	1e-10	Proteína de unión a clorofila a-b	1e-11
Ca 63	426	Proteína del cloroplasto del fotosistema II 10 kDa	1e-11	Polipéptido fotosistema II 10 kDa	2e-14
Ca 82	236	Proteína de unión a clorofila a-b	1e-05	Proteína de unión a clorofila a-b	3e-07
Ca 98	348	Proteína 6A de unión a clorofila a-b, isoforma cloroplástica	4e-08	Proteína de unión a clorofila a-b	5e-10
Ca 103	258	Proteína regulada por la luz Lir1	3e-07	Proteína regulada por la luz	3e-10
Ca 119	208	Proteína inducible del cloroplasto del fotosistema II	6e-15	Polipéptido del fotosistema II 19 kDa	2e-24
II. Estrés oxidativo					
Ensamble 2	608	Catalasa (EC: 1.11.1.6)	3e-17	Proteína de membrana	4e-26
Ensamble 6	348	Posible tioredoxina tipo f (EC: 1.11.1.20)	3e-54	Tioredoxina F2, del cloroplasto	8e-48
Ensamble 11	429	Proteína similar a metalotionina tipo-3	3e-22	Proteína similar a metalotionina tipo-3	1e-34
Ensamble 14	454	Proteína similar a metalotionina tipo-3	6e-22	Proteína similar a metalotionina tipo-3	1e-34
Ca 64	778	Proteína similar a metalotionina tipo-3	7e-17	Proteína similar a metalotionina tipo-3	6e-28

Anexo 6. Comparación de la posible identidad y características de las secuencias seleccionadas de la biblioteca SSH, expresadas en hojas del cultivar resistente ‘Calcutta 4’ infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* en un estadio temprano del desarrollo de la enfermedad, con la base de datos del Genbank y con el genoma completo de referencia de *Musa acuminata* var. (‘DH-Pahang’) (continuación).

Clon	pb	BlastX: Secuencia de proteína relacionada	Valor E	BlastX: <i>Musa acuminata</i> (‘DH Pahang’)	Valor E
III. Metabolismo primario			1e-29	Fumarilacetoacetasa	1e-37
Ca 68	383	Posible fumarilacetoacetato hidrolasa (EC: 3.7.1.2)			
IV. Metabolismo secundario					
Ensamble 12	217	S-adenosilmetionina sintetasa (EC: 2.5.1.6)	4e-24	S-adenosilmetionina sintasa	1e-22
V. Mantenimiento celular					
Ca 6g	137	Proteína de transferencia conjugativa TrbL tipo P	8e-10	No homología	
VI. Transporte					
Ensamble 3	181	Permeasas de aminoácidos	2e-14	Posible aminoácido permeasa no caracterizada	3e-14
VII. Elementos transponibles					
Ca 243	455	Posible transposasa (EC: 2.1.1.43)	6e-78	No homología	
VIII. Defensa					
Ensamble 17	439	Hidrolasa asociada a la pared celular	2e-34	No homología	
IX. Destino de proteínas					
Ensamble 13	421	Posible enzima conjugadora de la ubiquitina E2 (EC: 6.3.2.19)	4e-63	Posible enzima conjugadora de la ubiquitina E2	4e-53
X. Transducción de señales y tráfico intracelular					
Ca 4c	233	Receptor de distribución vacuolar	3e-26	Receptor de distribución vacuolar	2e-33
Ca 87	207	Factor de ribosilación ADP-proteína activadora de GTPasa AGD12	5e-24	Posible factor de ribosilación ADP-proteína activadora de GTPasa AGD12	8e-21
XI. No clasificadas					
Ca 45	583	Proteína no caracterizada	9e-30	Proteína del complejo T	3e-63
Ca 48	390	Proteína similar CASP	1e-05	Proteína de membrana	5e-26

Anexo 6. Comparación de la posible identidad y características de las secuencias seleccionadas de la biblioteca SSH, expresadas en hojas del cultivar resistente ‘Calcutta 4’ infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* en un estadio temprano del desarrollo de la enfermedad, con la base de datos del Genbank y con el genoma completo de referencia de *Musa acuminata* var. (‘DH-Pahang’) (continuación).

Clon	pb	BlastX: Secuencia de proteína relacionada	Valor E	BlastX: <i>Musa acuminata</i> (‘DH Pahang’)	Valor E
XI. No clasificadas					
Ca 128	863	Proteína hipotética	3e-60	Proteína unidora de ARN activadora inhibidora de plasminogén	1e-137
Ensamble 8	1305	Proteína hipotética	3e-91	Proteína hipotética	1e-74
Ensamble 9	283	Proteína hipotética	4e-21	Glicosiltransferasa	8e-26
XII. No homología					
Ca 9	300	No homología		Proteína hipotética	1e-23
Ca 16	1313	No homología			
Ca 19g	409	No homología			
Ca 22g	250	No homología			
Ca 24	408	No homología			
Ca 35	277	No homología			
Ca 42	227	No homología			
Ca 43	844	No homología			
Ca 46	1083	No homología			
Ca 47	1229	No homología			
Ca 52	1046	No homología			
Ca 60	872	No homología			
Ca 61	909	No homología			
Ca 66g	419	No homología			
Ca 70	788	No homología		Proteína hipotética	4e-24
Ca 72a	136	No homología		Proteína similar a HMG1/2	2e-13
Ca 72b	197	No homología			

Anexo 6. Comparación de la posible identidad y características de las secuencias seleccionadas de la biblioteca SSH, expresadas en hojas del cultivar resistente 'Calcutta 4' infectadas con *Mycosphaerella fijiensis* en un estadio temprano del desarrollo de la enfermedad, con la base de datos del Genbank y con el genoma completo de referencia de *Musa acuminata* var. ('DH-Pahang').

Clon	pb	BlastX: Secuencia de proteína relacionada	Valor E	BlastX: <i>Musa acuminata</i> ('DH Pahang')	Valor E
XII. No homología (continuación)					
Ca 74	949	No homología			
Ca 75	341	No homología			
Ca 77	1344	No homología			
Ca 79	1254	No homología			
Ca 84	270	No homología			
Ca 85	258	No homología		Proteína hipotética	1e-15
Ca 88c	111	No homología			
Ca 91	191	No homología			
Ca 92	1003	No homología			
Ca 94	215	No homología		Proteína ycf53 no caracterizada	7e-27
Ca 94g	778	No homología		Proteína hipotética	3e-06
Ca 95	804	No homología			
Ca 108	197	No homología			
Ca 113	188	No homología			
Ca 120	182	No homología			
Ca 132	289	No homología			
Ensamble 1	1219	No homología			
Ensamble 4	937	No homología			
Ensamble 5	1070	No homología			
Ensamble 10	1154	No homología			
Ensamble 15	360	No homología		Posible proteína no caracterizada	3e-16
Ensamble 18	412	No homología			