

**Centro de Bioplasmas
Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”
Cuba**

MAESTRÍA EN AGROBIOTECNOLOGÍA

**EFEECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y JASMÓNICO EN LA RESPUESTA DE
PLANTAS DE BANANO FRENTE A FILTRADO DE *FUSARIUM*
OXYSPORUM F. SP. *CUBENSE***

Autor (a): Lic. Jéssica Mendoza Rodríguez

Tutor (a): Dr. Nayanci de la Flor Portal González

2018

Para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea.

Alexandre Fleming

*A mi abuela por ser la estrella que me cuida siempre...
y a mis padres por su inagotable amor.*

*A todas las personas que me apoyaron y me instaron a seguir
adelante, un simple gracias no es suficiente.*

ABREVIATURAS

ACTIGARD - Acibenzolar - S -metilo

AOC - Alleno Oxido Ciclasa

AOS - Alleno Oxido Sintetasa

ASM - Acibenzolar - S -metilo

Avr - Avirulencia

BION - Acibenzolar - S -metilo

CAT - Catalasa

CTAB - Bromuro de cetiltrimetilamonio

ET - Etileno

ETI - Inmunidad Disparada por Efectores

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético

FC - Filtrado de Cultivo

Foc - *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Foc TR4 - *F. oxysporum* f.sp. *cubense*
raza 4 Tropical.

Foc1 - *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Fol - *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Fox - *Fusarium oxysporum*

GCV - Grupo de Compatibilidad Vegetativa

Genes R - Genes de Resistencia

ISR - Resistencia Sistémica Inducida

JA - Ácido Jasmónico

LOX - Lipoxigenasa

mpi - minutos posteriores a la inducción

myc2 - factor de transcripción

NBS-LRR - Proteínas con repetición rica en leucina y sitio de unión a nucleótidos

NPR1 - Nonexpresser of Pathogenesis Related 1

PAL - Fenilalanina Amonio Liasa

PAMPs - Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PDA - Agar Dextrosa de Papa

POX - Peroxidasa

PR - Relacionado con la patogénesis

PR1 - Pathogenesis Related-1

PR3 - Pathogenesis Related-3

Proteínas R - Proteínas de Resistencia

PRRs - Receptores de Reconocimiento de Patrones

PTI - Inmunidad Disparada por PAMP

PVP - Polivinilpirrolidona

RLKs – Proteínas quinasas receptoras

RLPs – proteínas receptoras

ROS - Especies Reactivas de Oxígeno

SA - Ácido Salicílico

SAR - Resistencia Sistémica Adquirida

Si - Silicio

SOD - Superóxido dismutasa

ÍNDICE	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Sistemática e importancia económica del género <i>Musa</i>	4
2.2 La marchitez causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en el cultivo del banano	5
2.2.1 Síntomas de la marchitez por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	6
2.2.2 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> , agente causal de la marchitez del banano.....	7
2.2.3 Infección y ciclo de vida de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	8
2.3 Estrategias actuales para el control de la marchitez del banano.....	9
2.4 Mecanismos y bases moleculares de la defensa de plantas a patógeno	11
2.4.1 Mecanismos de reconocimiento o de percepción de señales	12
2.4.2 Mecanismos de traducción de señales	14
2.4.3 Resistencia sistémica adquirida (SAR)	15
2.5 Inductores de resistencia	17
2.6 Aplicaciones de inductores de resistencia en plantas para el control de enfermedades.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.0 Generalidades de los experimentos	19
3.1 Determinación de la activación de las rutas del ácido salicílico y el ácido jasmónico en plantas de banano inoculadas con el filtrado de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	22
3.2 Evaluación del efecto de Actigard y el Biojas en la inducción de la resistencia del cultivar Manzano frente al filtrado de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 Determinación de la activación de las rutas del ácido salicílico y el ácido jasmónico en plantas de banano inoculadas con el filtrado de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	28
4.2 Evaluación del efecto de Actigard y el Biojas en la inducción de la resistencia del cultivar Manzano frente al filtrado de cultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1	53
5. CONCLUSIONES	46
6. RECOMENDACIONES	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	61

RESUMEN

Los bananos se cultivan en más de 130 países, en regiones tropicales y subtropicales. Constituyen una importante fuente de alimentación y aporte económico en gran parte de la población mundial. La marchitez del banano causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) se considera una de las amenazas de los bananos a nivel mundial y un factor limitante en la producción de dicho cultivo. El presente trabajo tuvo como objetivos determinar la activación de genes de las rutas del ácido salicílico y el ácido jasmónico en plantas de banano inoculadas con el filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y evaluar el efecto del Actigard y el Biojas en la inducción de la resistencia del cultivar Manzano frente al filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. La expresión de genes se determinó por qPCR en tiempo real. Se evaluó la influencia de diferentes dosis de Actigard (6; 12 y 18 g L⁻¹) y Biojas (0,5; 1,0; 1,5 ml L⁻¹), así como un tratamiento combinado de ambos inductores. Los genes de las rutas del SA y del JA incrementaron su expresión en el cultivar resistente con la aplicación del filtrado de cultivo de Foc. La aplicación de Actigard y Biojas protegen las plantas de banano frente a la fusariosis. El Biojas indujo mayor resistencia en el cultivar Manzano con la disminución del área de la lesión. Lo que permite utilizar productos comerciales con estos ingredientes activos para el control de la fusariosis.

Palabras claves: bananos, *Fusarium oxysporum*, inductores de resistencia, área de la lesión

1. INTRODUCCIÓN

Los bananos (*Musa* spp.) se cultivan en más de 130 países, en regiones tropicales y subtropicales (Mohapatra, *et al.*, 2010; Guo, *et al.*, 2014), desde el sudeste asiático de donde son nativos, hasta Oceanía y Sudamérica. Los bananos representan el octavo cultivo más importante del mundo, y el cuarto más significativo en los países en vías de desarrollo. Constituyen una importante fuente de alimentación y aporte económico en gran parte de la población mundial (Hwang, *et al.*, 2004; Mohapatra, *et al.*, 2010). La producción en el 2017 alcanzó 18,1 millones de toneladas métricas. El volumen de producción y de exportación a nivel mundial de este cultivo sólo es superado por el trigo, el arroz y el maíz (FAO, 2017).

Sin embargo, existen numerosas enfermedades, que han ocasionado graves pérdidas en todas las regiones productoras de Musáceas. El marchitamiento causado por *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* (Foc), se considera una de las enfermedades fúngicas más importantes de los bananos y plátanos a nivel mundial (Xiao, *et al.*, 2013). La enfermedad constituye un factor limitante tanto para la producción de bananos destinada a la exportación como la dirigida al mercado interno (Hwang, *et al.*, 2004; Batlle, *et al.*, 2009).

Fusarium oxysporum f sp. *cubense* es un patógeno vascular con un ciclo de vida hemibiótrofo. Produce clamidosporas que permiten al hongo persistir en el suelo y ser viable por más de 30 años en ausencia del hospedero (Dita, *et al.*, 2010). Es una restricción importante en la producción de cultivares de bananos susceptibles en áreas infectadas en todo el mundo (Ploetz, *et al.*, 2015a). Está dividido en cuatro razas basadas en la susceptibilidad del hospedero (Groenewald, *et al.*, 2006). Hasta el momento solo se han informado la presencia en América de las razas 1 y 2. Sin embargo, la raza 4 (Foc4) afecta todos los cultivares susceptibles y resistentes a las razas 1 y 2 del patógeno y se confirmó por primera vez en Jordania, fuera de Asia sudoriental, en 2013 (García-Bastidas, *et al.*, 2014). La entrada potencial del patógeno puede tener un gran impacto económico y social

para la industria de Musáceas en la región de América. Más del 80% de los cultivares de banano que se producen a nivel mundial son susceptibles a la raza 4 (Thakker, *et al.*, 2013).

Dita, *et al.* (2010) informa que la única forma de control efectiva y sostenible tanto económica como ambiental para el control de la fusariosis es la resistencia del hospedero. Sin embargo, como para la raza 4 por ejemplo no existe resistencia varietal se hace necesario buscar alternativas que permitan mantener la producción que está amenazada con raza 1 hasta que se desarrollen clones resistentes.

La aplicación de inductores de resistencia sistémica en cultivos de interés agrícola, se ha convertido en una herramienta estratégica en el manejo de las enfermedades. Capaz de activar los propios mecanismos de defensa de la planta frente al ataque del patógeno. Así como proporcionar una protección de larga duración y disminuir la aplicación de plaguicidas químicos en el control de agentes causantes de enfermedades, entre otras ventajas (Méndez, *et al.*, 2010).

Entre estos productos se encuentran el Acibenzolar-s-metilo, Bion 50 o Actigard (ingrediente activo: ácido salicílico) y los metil- jasmonatos como el Biojas (ingrediente activo: ácido jasmónico). Estos productos se basan en la activación de las rutas del ácido salicílico y la ruta del ácido jasmónico. En *Arabidopsis Thomma*, *et al.* (1999) demostró que estas rutas funcionaban de manera antagónica, y que la ruta del ácido salicílico era más efectiva para patógenos biótrosos mientras que las del jasmónico, lo era para necrótrofos. Derksen, *et al.* (2013) señalan que, aunque existen interacciones en las que ambos compuestos actúan de manera sinérgica, son más los casos en que lo hacen de manera antagónica. No se conoce si durante la respuesta del banano a *Fusarium* juega un papel la ruta del salicílico, la del jasmónico o ambas.

Hipótesis

Las plantas de banano responden al ataque de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* mediante la activación de las rutas del ácido salicílico y ácido jasmónico lo que permite utilizar productos comerciales con estos ingredientes activos para el control de la fusariosis.

Objetivo general

Determinar el efecto del ácido salicílico y jasmónico en la respuesta de plantas de banano frente a filtrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1

Objetivos específicos

1. Determinar la activación de genes de las rutas del ácido salicílico y el ácido jasmónico en plantas de banano inoculadas con el filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1.
2. Evaluar el efecto del Actigard y el Biojas en la inducción de la resistencia del cultivar Manzano frente al filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1.

Novedad científica

Se determinó que el ácido salicílico y el ácido jasmónico participan en la respuesta de Banano contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Es posible utilizar los productos que tienen estos ingredientes activos para el control de la fusariosis.

Valor práctico

Se demostró que productos comerciales con ácido salicílico y ácido jasmónico como ingredientes activos, son efectivos en el control de fusariosis. Esto permite utilizar estos compuestos amigables con el medio ambiente en lugar de pesticidas químicos en la protección del cultivo del banano.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistemática e importancia económica del género *Musa*

Los bananos son monocotiledóneas pertenecientes al Reino *Plantae*, División *Magnoliophyta*, Clase *Liliopsida*, orden *Zingiberales* y a la familia *Musaceae*, la cual incluye al género: *Musa* (Simmonds, 1962). Las Musáceas comestibles se dividen en dos tipos: bananos y plátanos. Se originaron de dos especies silvestres a partir de cruces naturales inter e intraespecíficos de diploides salvajes AA y BB ($2n = 2X = 22$) derivados de *Musa acuminata* Colla genoma A (D'Hont, *et al.*, 2012) y *Musa. balbisiana* Colla, respectivamente genoma B (Davey, *et al.*, 2013). De esta manera las letras A y B sirven para la clasificación e identificación de cultivares (Stover, *et al.*, 1987). Varias combinaciones genómicas existen [diploide AB; triploide ($2n=3X=33$) AAB, ABB; y tetraploide menos frecuentes ($2n=4X=44$) AAAB, AABB] producto de la hibridación natural de las dos especies (Shetty, *et al.*, 2016).

Los bananos se cultivan en más de 130 países, en regiones tropicales y subtropicales (Mohapatra, *et al.*, 2010), desde el sudeste asiático de donde son nativos, hasta Oceanía y Sudamérica. Se considera la fruta intertropical más consumida del mundo. La producción en el 2017 se valoró en 18,1 millones de toneladas métricas (FAO, 2017).

El banano es un componente importante de la dieta humana por su elevado aporte energético. Es rico en vitamina A, vitamina C y triptófano, presentan alto contenido en potasio, bajo en sodio y en grasas. Se consumen en disímiles maneras; como fruta se incorpora en trozos a ensaladas, gelatinas y otros postres, así como a batidos y otras bebidas. (Thompson, 1995). En Uganda y Sudán, se utilizan los bananos para producir alcohol de banano o *waragi*.

El volumen de producción y de exportación de bananos en el mundo sólo es superado por el trigo (*Triticum* spp.L.), el arroz (*Oryza sativa* L.) y el maíz (*Zea mays* L.). La fruta ocupa

el cuarto lugar en consumo y en importancia económica, y el “número uno” en términos de producción internacional como producto frutícola. Además, constituye una importante vía de ingresos de pequeños productores (FAO, 2017).

Sin embargo, numerosas enfermedades, las cuales han ocasionado graves pérdidas económicas se encuentran en las regiones productoras de Musáceas. Entre las principales, se ha dedicado atención especial por los daños que ocasionan en los cultivares a la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) (Sierotzki, *et al.*, 2013) y al marchitamiento por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) (Foc) (Lu, *et al.*, 2013; Siddhesh, *et al.*, 2014; Ploetz, 2015). La marchitez del banano ha sido un problema de la industria bananera por muchos años. Se considera una de las enfermedades fúngicas más importantes de los bananos y plátanos a nivel mundial (Xiao, *et al.*, 2013) y un factor limitante tanto para la producción de bananas destinada a la exportación como la dirigida al mercado interno (Hwang, *et al.*, 2004; Batlle, *et al.*, 2009).

En este contexto uno de los puntos claves en las investigaciones en el proceso de mejoramiento genético de *Musa* es el desarrollo de líneas parentales diploides mejoradas y resistentes a las enfermedades (Ortiz, *et al.*, 2014). A pesar de las dificultades, los fitomejoradores de *Musa* han logrado producir híbridos promisorios con niveles incrementados de resistencia a la Sigatoka negra, y se describen como resistentes a cepas de las razas 1 y 2 de Foc (Erima, *et al.*, 2016). Sin embargo, estos híbridos no son comercializados por la industria bananera (Kubiriba, *et al.*, 2016).

2.2 La marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en el cultivo del banano

La marchitez del banano es una enfermedad "policíclica" y presenta un rango relativamente amplio de hospederos dentro del género *Musa* (Ploetz, *et al.*, 2015a). Se encuentra entre las diez enfermedades más importantes en la agricultura (Siddhesh, *et al.*, 2014). La

enfermedad fue conocida como “Mal de Panamá debido a que provocó la epidemia que causó la destrucción en la industria bananera, basada en la variedad Gros Michel en Panamá (Stover, 1962). La industria y el crecimiento del comercio bananero se ha afectado en los países productores. Esta enfermedad es una de las limitaciones más importantes en la producción de banano en la actualidad y causa graves pérdidas económicas en todo el mundo (Fourie, *et al.*, 2011; Guo, *et al.*, 2014).

2.2.1 Síntomas de la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

La marchitez de los bananos se describe como una clásica enfermedad de marchitamiento vascular. Los síntomas externos durante la infección y colonización causan marchitamiento gradual, amarillamiento progresivo de parte inferior de las hojas de banano, colapso eventual en el pecíolo y división longitudinal de las vainas foliares externas en el pseudotallo (Drenth, *et al.*, 2016).

El proceso de infección puede terminar y no progresar, cuando la planta no sea susceptible o no esté predispuesta por un estrés ambiental (Siddhesh, *et al.*, 2014). En cuanto a los síntomas internos de las plantas de banano infectadas se puede observar la decoloración de rizomas y necrosis de haces vasculares en el pseudotallo (Guo, *et al.*, 2014). Se ha encontrado que el hospedero resistente responde a una señal en los vasos infectados por la formación de calosa, geles vasculares y tilosas que inmovilizan las esporas del patógeno. El desarrollo de estas estructuras se ha examinado en detalle por microscopía electrónica. Además, la síntesis y liberación de sustancias fenólicas que se producen y la lignificación de las paredes detienen la invasión del patógeno durante la interacción (Dong, *et al.*, 2012).

Solo unas pocas especies de patógenos son capaces de colonizar el sistema vascular de las plantas y causar enfermedades de marchitamiento. Estas incluyen a *Fusarium oxysporum* (Fox) y varias especies pertenecientes a los géneros *Verticillium*, *Ceratocystis* y *Ophiostoma*. Los síntomas asociados a las enfermedades de marchitamiento vascular

dependen de las especies fúngicas y de las plantas hospederas, pero en general incluye decoloración de los vasos, marchitamiento, defoliación, retraso del crecimiento y muerte de las plantas (de Sain, *et al.*, 2015).

2.2.2 *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*, agente causal de la marchitez del banano

Fusarium oxysporum se encuentra entre los diez patógenos importantes desde el punto de vista científico dada su incidencia en cultivos de interés agrícola (Dean, *et al.*, 2012). *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *ubense* (E. F. Smith) Snyder y Hansen (Foc). Perteneciente al Reino: *Fungi*, Phylum *Ascomycota*; Clase *Sordariomycetes*; Orden *Hypocreales*; Familia *Nectriaceae*; Género *Fusarium* (Dita, *et al.*, 2010). Comparte un ciclo de infección similar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* (Fol) el agente causal de la enfermedad del marchitamiento del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Guo, *et al.*, 2014).

La supervivencia, proliferación y dispersión de las poblaciones patogénicas como no patogénicas de Foc existentes se debe a la producción de tres tipos de esporas en su ciclo de vida: macroconidios, microconidios y clamidosporas (Agrios, 2005). Foc presenta un estado reproductivo asexual (anamorfo), y sin estado sexual (teleomorfo) conocido hasta la actualidad. Aunque la presencia en algunos aislamientos de los genes idiomórficos Mat 1 y Mat 2 sugieren que la historia evolutiva de la especie en algún momento incluyó la reproducción sexual (Fourie, *et al.*, 2011).

Las formas patogénicas a las plantas causan una enfermedad de marchitamiento y están agrupadas en *formae speciales* basado en su rango de hospederos, algunas son subdivididas en razas patogénicas. El término raza en este patosistema no implica una relación genética definida con el hospedero, como ocurre con otros patosistemas (Chellappan, *et al.*, 2016; Gilardi, *et al.*, 2016). Sin embargo, las razas clasifican la variación patogénica de Foc (Ploetz, 2006). Foc está dividido en cuatro razas basadas en la

susceptibilidad del hospedero (Groenewald, *et al.*, 2006). Tres de las cuales son patógenos al género *Musa* (Stover, 1962).

La raza 1 es patogénica en varios cultivares "Gros Michel" (genotipo AAA), "Silk"(genotipo AAB), "Pome", y "Pisang Awak"(Stover, *et al.*, 1972), mientras que la raza 2 infecta a los híbridos triploides (ABB) como el Bluggoe, y especies relacionadas a bananos de cocción (Swarupa, *et al.*, 2014). La raza 3 solo infesta al género *Ensete*. Por el contrario, la raza 4 tiene una amplia gama de hospederos en cultivares del grupo Cavendish, así como a especies susceptibles a la raza 1 y 2. A su vez, la raza 4 se subdivide en Raza Tropical (RT4) y Subtropical (RS4). Foc RS4 ataca a cultivares de banano en regiones subtropicales como Taiwán, Islas Canarias, Sudáfrica y Australia. Mientras RT4 afecta a cultivares en Australia y las regiones tropicales del sur y este de Asia: China, Indonesia, Malasia, y Filipinas (Guo, *et al.*, 2014).

2.2.3 Infección y ciclo de vida de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

En su ciclo de vida Foc puede permanecer en residuos de bananos infectados, en forma de clamidosporas. Las esporas germinan y forman hifas fúngicas en diversas condiciones nutricionales y ambientales. Las clamidosporas se estimulan por secreciones radicales de plantas hospederas y no hospederas o con tejido sano de un cultivar susceptible. Si se encuentra cerca una planta hospedera, la infección puede iniciar en las raíces, en partes de la planta por encima del suelo, a través del aire o el agua (Ma, *et al.*, 2013).

Las hifas se propagan alrededor de las raíces y colonizan su superficie. Luego cruzan la epidermis e invaden y colonizan los vasos del xilema de la raíz (Batlle, *et al.*, 2009). El hongo penetra a la planta a través de las raíces terciarias. Después de infectar con éxito las raíces del banano, el patógeno ingresa al sistema vascular del rizoma y pseudotallo (Moore, *et al.*, 1995).

Una vez dentro del xilema, el hongo produce conidios, los cuales son transportados a lo largo de los haces vasculares donde inician nuevas zonas de infección, y ocasionan su obstrucción y, como consecuencia, el movimiento del agua y nutrientes se reduce y causa la muerte de la planta. Por último, las clamidosporas; retornan al suelo cuando la planta muere y persisten en el suelo por más de 30 años o pueden reiniciar un nuevo ciclo de infección a través del agua de lluvia (Davis, 2005).

Existen pocas opciones efectivas de control del patógeno, el uso de fungicidas, son en gran medida ineficaces. Por tanto, la necesidad crítica de una mejor comprensión de la especificidad del hospedero para este patógeno permitiría establecer políticas de control útiles en la contención de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Ploetz, 2015).

2.3 Estrategias actuales para el control de la marchitez del banano

El conocimiento y la tecnología disponible permiten implementar políticas cuarentenarias e impedir así la diseminación de patógenos, aunque siempre es más seguro disponer de líneas parentales mejoradas y resistentes a las enfermedades. La Biotecnología de las plantas tiene las potencialidades para jugar un papel clave en la producción sostenible de bananos. Por otra parte, existe una necesidad crítica de obtención de bananos resistentes que cumplan con los estándares locales y de exportación (Ploetz, *et al.*, 2015b).

En la actualidad no existen estrategias y técnicas de manejo eficiente para la marchitez del banano ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Ploetz, 2015). La naturaleza policíclica de la enfermedad, la producción perenne del cultivo, así como los cultivares de banano y los sistemas de producción que difieren entre las regiones productoras impiden el desarrollo de medidas de control eficientes donde el uso de fungicidas se considera ineficaz (Ocimati, *et al.*, 2013; Drenth, *et al.*, 2016).

Por otra parte Dita, *et al.* (2010) proponen estrategias y técnicas de control para una posible supresión-contención de Foc. Los autores utilizan un manejo integrado de plagas como la fumigación del suelo, la rotación de cultivos, el uso de control químico, biológico, cultural, manejo de la nutrición y pH de los suelos.

Fortunato, *et al.* (2012) determinaron el efecto de silicio (Si) en la reducción de los síntomas de marchitamiento por *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Foc) en plantas de banano Gran Enano (resistente) y Maca (susceptible). Los resultados de este estudio mostraron que suministrar Silicio (Si) para cultivares susceptibles de Foc, obtiene una reducción de la intensidad de la enfermedad y puede desempeñar un papel clave en plantas de banano que se cultivan en suelos infestados por este patógeno.

El uso de agentes de biocontrol ha demostrado ser una estrategia ambiental segura para el manejo de la enfermedad (Raman, *et al.*, 2016; Fu, *et al.*, 2017). Existen evidencias experimentales *in vitro* e invernadero de que *Trichoderma spp.*, *Fusarium oxysporum* no patogénicos y algunas especies de bacterias tienen potencial para el control biológico de Foc.

Sin embargo, la tecnología aun es incipiente y su éxito depende de varios factores. El problema más grave para las plantaciones de banano con años de cultivo continuo es la pérdida de diversidad biológica del suelo (Gang, *et al.*, 2013). Se recomienda el uso de *Trichoderma spp.* u otros microorganismos que estimulen la actividad microbiológica y aumenten la supresividad del suelo. Pérez, *et al.* (2003) informaron que el uso combinado de material de siembra (vitroplantas) libre de la enfermedad y *Trichoderma harzianum* en Cuba, permitió un manejo sostenible de las razas 1 y 2 de Foc por períodos de hasta cinco años en áreas donde la enfermedad presentó una alta incidencia.

Existe un rico acervo de material genético entre las especies silvestres que aún puede ser utilizado en el mejoramiento genético de Musáceas (Li, *et al.*, 2014) Se han realizado numerosos estudios sobre estrategias para el mejoramiento genético de la resistencia a las enfermedades. Sin embargo, todos los cultivares de exportación de banano que se cultivan en la actualidad son selecciones de mutantes somáticos del grupo Cavendish y tienen una base genética muy estrecha (Janssens, *et al.*, 2016).

La base genética ancestral exacta de los cultivares de banano domesticados no se ha estudiado del todo (De Langhe, *et al.*, 2010). Esto dificulta la elección de parentales adecuados para que los cruces produzcan nuevos híbridos. En la actualidad, no se cuenta con variedades transformadas genéticamente, ni disponibles en el mercado; sin embargo, existen potencialidades para la manipulación genética de especies de banano resistente a enfermedades. La eficiencia de la mejora genética en *Musa* depende de herramientas innovadoras de biología celular y molecular (Venkatesh, *et al.*, 2013; Ortiz, *et al.*, 2014)

A pesar de los avances logrados hasta la fecha, la comprensión de la interacción hospedero-patógeno en términos de defensa y de las rutas relacionadas con los mecanismos de resistencia permite identificar pasos críticos para desarrollar cultivares resistentes con el empleo de enfoques genéticos (Usharani, *et al.*, 2016).

2.4 Mecanismos y bases moleculares de la defensa de plantas a patógeno

Las plantas, a través de un proceso de coevolución con los patógenos han desarrollado mecanismos de defensa para resistir la colonización. La respuesta de defensa a diferentes patógenos y plagas les permiten de manera temprana reconocer, detener y contrarrestar la infección. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales constitutivos y mecanismos de defensa químicos constitutivos.

A diferencia de la defensa constitutiva, los mecanismos de resistencia inducida, se activan como respuesta al ataque de patógenos (Collinge, *et al.*, 1994). La resistencia inducida involucra cambios en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson, 1998).

2.4.1 Mecanismos de reconocimiento o de percepción de señales

Existen varios modelos para explicar los mecanismos moleculares de reconocimiento. Aunque en ninguno se aborda la interacción Foc-banano, constituyen la base para comprender la interacción planta-patógeno. La Hipótesis gen-por-gen explica la existencia de un gen *R* simple de la planta que interactúa específicamente con un gen *Avr* simple del patógeno (Flor, 1971).

Con el aislamiento, clonaje y caracterización molecular de varios genes *R* y genes *Avr* de diferentes especies de plantas y patógenos (Takken, *et al.*, 2000), ha sido posible predecir la estructura, localización y posibles mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la interacción entre las proteínas *R* y *Avr* (De Wit, 1997).

Las proteínas *R* se dividen en dos clases que dependen de su localización en la célula, así como la disposición de dominios LRR. En algunas proteínas *R* se observan rasgos distintivos como un dominio extracelular rico en leucina (LRR), dominio transmembrana y una pequeña cola citoplasmática con proteína quinasa conocidas como *receptor like kinasa* (RLKs). Si se desconoce la proteína con que termina el dominio citoplasmático se les denomina *receptor like proteins* (RLPs).

Estas proteínas desempeñan una función centinela, que es capaz de realizar el reconocimiento extracelular (Gabriel, 1999). Según De Wit (2016) las proteínas *Cf* por

ejemplo, que se encuentran ligadas a la membrana citoplasmática de tomate pertenecen al grupo de las *receptor like proteins* (RLPs) y le confieren resistencia al patógeno *Cladosporium fulvum*.

Otras proteínas R con dominios ricos en leucina (LRR) y regiones o sitios de unión a nucleótidos (NBS-LRR) tienen ubicación citoplasmática capaces de unirse a GTP y ATP y que participan en la transducción de señales (Pan, *et al.*, 2000). Alternativamente al sitio de unión a nucleótidos de estas proteínas presentan una región con alta similitud a la proteína receptora Interleukina-1 y Toll, involucradas en la inmunidad innata en mamíferos y *Drosophila*, respectivamente.

La otra clase de proteína R localizada en el interior de la célula codifica serina/threonina o proteína quinasa, por ejemplo, la proteína Pto de tomate que reconocen los efectores AvrPto de *Pseudomonas. syringae* pv. tomato Van Hall (Thapa, *et al.*, 2016). Pto posee una región con actividad quinasa, por lo cual se le ha asignado una función clave en las vías de señales mediadas por cascadas de fosforilación. Además, Pto es la única proteína R que ha demostrado que interactúa directamente con la proteína de avirulencia AvrPto (Tang, *et al.*, 1996). Los genes R no son responsables directos de la resistencia, pero sí tienen una función determinante de la especificidad del reconocimiento y actúan como iniciadores de la defensa (De Wit, 1997).

Se han identificado numerosas proteínas receptoras (FLS2, BRI1, EF-TuR) implicadas en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs), moléculas conservadas, que se secretan o están en la superficie de los microorganismos. Entre este grupo de moléculas se incluyen los lipopolisacaridos (LPS), el peptidoglicano (PGN), la flagelina (Fgl22) y la proteína EF-Tu bacteriana (Nürnbergger, *et al.*, 2002; Bittel, *et al.*, 2007). También los polímeros de azúcar (quitina, glucanos y mananos) que conforman la pared celular tanto de hongos como de las células vegetales.

Este reconocimiento provoca el desarrollo de una respuesta de inmunidad inducida por PAMPs (PTI) que los microorganismos deben vencer para lograr la colonización de los tejidos vegetales (Jones, *et al.*, 2006). En la interacción por años entre los patógenos y las plantas, los primeros evolucionan, con nuevas proteínas llamadas efectores que no son detectados por las proteínas receptoras de las plantas, lo que ocasiona la susceptibilidad de las mismas. Sin embargo, las plantas sintetizan nuevas proteínas R que reconocen a los efectores patogénicos. A este tipo de inmunidad se le denomina inmunidad inducida por efectores (ETI) (Sarris, *et al.*, 2016).

La PTI y la ETI son las dos ramas principales de la inmunidad en plantas y se definen de acuerdo al tipo, la localización del receptor, la(s) molécula(s) detectada(s) y los componentes de las señales específicas que desencadenan (Hein, *et al.*, 2009). Existe una constante carrera evolutiva entre los efectores patogénicos y los componentes de la inmunidad en plantas. Esto provoca la ocurrencia de gran selección sobre los genes de los efectores, las moléculas diana de los efectores y los receptores en la planta (Dong, *et al.*, 2014). De manera general el reconocimiento de los patógenos mediante estas proteínas receptoras provoca una serie de cambios celulares, que conducen a la activación de la expresión de genes de defensa.

2.4.2 Mecanismos de traducción de señales

La detección temprana de la presencia de un patógeno por parte de la planta, puede desencadenar una respuesta de hipersensibilidad (HR). Se caracteriza por moléculas que le permiten a la planta responder a un amplio rango de estímulos que involucran, entre otros, el influjo de calcio, alcalinización extracelular/acidificación citoplásmica, canales aniónicos de Cl⁻ y la activación de proteínas por mitogénos (MAP quinasas), fosfolípidos transmembranales, especies reactivas de oxígeno (O₂⁻, H₂O₂, [•]OH), radicales de NO, y sistemas de señalización por SA, JA, ET, ácido abscísico (ABA), ácidos grasos, así como la

activación transcripcional de un grupo de genes relacionados con la defensa (Vidhyasekaran, 2008; Mandadi, *et al.*, 2013).

La principal función de estas moléculas de señalización consiste en transducir los estímulos extracelulares reconocidos por receptores de la célula a un gran número de moléculas blanco, que en completa coordinación integran respuestas intracelulares altamente específicas al estímulo causado por el patógeno o por elicitores (Vidhyasekaran, 2008).

El ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico/etileno (JA/ET) son importantes moléculas de señalización en respuestas de defensa a patógenos. La señalización mediada por SA provee protección contra patógenos biótropos como hongos, oomicetos, bacterias y virus tales como: *Pseudomonas syringae*, *Peronospora parasítica*, *Turnip crinkle virus* (TCV) y *Cucumber mosaic virus* (CMV). En contraste, la señalización por JA/ET activa la respuesta de defensa contra hongos necrótrofos tales como *Botrytis cinerea* y *Alternaria brassicicola* (Glazebrook, 2005).

Por otro lado, el JA/ET actúan sinérgicamente para inducir la expresión de ciertos genes de defensa tales como PDF1.2, PR-3 y PR-4. Mientras que SA y JA pueden actuar sinérgicamente o antagónicamente durante la activación de genes de defensa ante un patógeno específico (Devadas, *et al.*, 2002). Por lo tanto la resistencia inducida por patógenos es regulada por una red de interconexiones de rutas de defensa en donde el SA y JA/ET son moléculas claves de señalización (Glazebrook, 2005).

2.4.3 Resistencia sistémica adquirida (SAR)

La SAR se activa local y sistémicamente tras la infección de la planta por patógenos que producen necrosis (virus, bacteria u hongos), como por agentes químicos. La SAR se caracteriza por ser una resistencia de amplio espectro, es decir, que confiere resistencia no sólo al patógeno que la ha activado, sino también a otros patógenos. La activación de SAR

está acompañada de un incremento endógeno, local y sistémico, del SA y de compuestos de naturaleza fenólica (Oostendorp, *et al.*, 2001).

Esta acumulación de SA activa una serie de proteínas reguladoras, como NPR1, y factores transcripcionales (e.g. TGAs) que controlan la expresión de genes de defensa que codifican proteínas PR (Patogénesis – Related). La aplicación exógena de SA sobre la superficie de una planta es capaz de inducir una respuesta de defensa similar a la activada en la SAR. Se han identificado agentes químicos capaces de inducir SAR ya que son análogos estructurales del SA como: ASM, BTH, BION, o ACTIGARD, pero que no muestran actividad antimicrobiana “*in vitro*” (Oostendorp, *et al.*, 2001).

La resistencia sistémica inducida por patógenos esta mediada por una ruta asociada y dependiente de SA, y por una ruta independiente de SA, ligada al ácido jasmónico (JA) y al etileno (Reymond, *et al.*, 1998). La ruta dependiente de SA permite el desarrollo de la SAR y la expresión de genes que codifican proteínas de defensa, denominadas proteínas PR. La ruta ligada al JA y etileno, conduce a la expresión de genes que codifican proteínas denominadas defensinas, tioninas o proteínas antimicrobianas (AMP), inhibidores de proteasas y otras proteínas PR no inducidas por SA.

Frecuentemente ambas rutas se entrecruzan y pueden inducir compuestos o proteínas de defensa comunes. Dependiendo del patógeno que infecta, el tipo de compuestos de defensa inducidos por la planta puede variar predominando los inducidos por la vía de SA, o por la de JA y etileno.

En cualquier caso, el resultado es la inducción, de forma sistémica, de proteínas y compuestos de defensa que incluyen proteínas enzimáticas de la vía de los fenilpropanoides (fenilalanina amonio liasa, PAL; chalcona sintasa; CHS, peroxidasas, etc.), proteínas asociadas al estrés oxidativo (superóxido dismutasa, SOD; catalasa, CAT) glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HyP), relacionadas con el reforzamiento de la pared

celular, y glucanasas y quitinasas, que hidrolizan las paredes celulares de los hongos, entre otras (Reymond, *et al.*, 1998).

2.5 Inductores de resistencia

En los últimos años, existe un consenso general de que la única forma de control efectiva y sostenible tanto económica como ambiental para esta enfermedad es la resistencia del hospedero (van der Berg, *et al.*, 2007; Dita, *et al.*, 2010). La aplicación de inductores de resistencia en cultivos de interés agrícola se ha convertido en una herramienta estratégica en el manejo de las enfermedades en los cultivos; capaz de acelerar la respuesta de defensa de la planta al ataque del patógeno; así como proporcionar una protección de larga duración, y disminuir la aplicación de plaguicidas químicos entre otras ventajas (Borges, *et al.*, 2004; Mejía, *et al.*, 2009)

En este sentido, se han desarrollado productos comerciales que son compatibles con el ambiente e inducen a la planta a activar sus mecanismos de defensa contra las enfermedades. Algunos de estos productos se han comercializado. Entre ellos están el acibenzolar-s-metil, la menadiona bisulfito de sodio, los fosfitos y los metil jasmonatos (Borges, *et al.*, 2004; Fernández-Falcón, *et al.*, 2009; Méndez, *et al.*, 2010)

La idea de acelerar la respuesta de la planta mediante la aplicación de inductores de resistencia sistémica supondría, una alternativa biológica, ambiental y comercialmente viable, a los métodos actuales de control de patógenos mediante el uso tradicional de pesticidas químicos.

2.6 Aplicaciones de inductores de resistencia en plantas para el control de enfermedades

En este sentido, compuestos como el INA, BTH, ASM y Probenazol y Messenger™, entre otros, están considerados como compuestos compatibles con el medioambiente y se comercializan pues mejoran la resistencia de las plantas a enfermedades producidas por

patógenos. Se ha desarrollado un producto compuesto fundamentalmente por peróxido de hidrógeno Oxycom™ que al aplicarse sobre *Phaseolus vulgaris* en experimentos de campo y en el laboratorio, ha demostrado que induce la expresión de genes relacionados con las respuestas sistémicas de defensa a un nivel comparable a como lo hace el BTH y el SA (Kim, *et al.*, 2001).

Campbell, *et al.* (2004) utilizaron la aplicación del acibenzolar-S-metilo para la inducción de resistencia en el cultivo de la uva (*Vitis vinífera*) como alternativa para el control del moho polvoriento. Otros estudios realizados por Parkunan, *et al.* (2011) hacen referencia al mismo producto, pero con mezclas de especies de bacilos en el crecimiento y vigor del cultivo del tabaco.

En la agricultura se aplican inductores de resistencias para proteger a las plantas contra patógenos. Estos inductores no solo activan la resistencia sistémica adquirida (SAR) sino también la resistencia sistémica inducida (ISR). Algunos de estos compuestos como el ácido salicílico o sus análogos y los metil-jasmonatos se aplican en numerosos cultivos. Sin embargo, en la actualidad no están del todo esclarecidos los mecanismos moleculares y el entrecruzamiento de rutas de defensa, en adición del papel que tienen el ácido salicílico y el ácido jasmónico en la respuesta defensiva en la interacción Banano- *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.0 Generalidades de los experimentos

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Interacción Planta-Patógeno del Centro de Bioplantitas de la Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”. La activación de los genes de las rutas del ácido salicílico y del ácido jasmónico se determinó en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Las Antillas de Martinica.

Microorganismo. Para el desarrollo de esta investigación se utilizó la cepa correspondiente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 Grupo de Compatibilidad Vegetativa (GCV) [01210]. Donada por el cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). La conservación de la cepa se realizó en papel de filtro. La cepa se sembró en placas de Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y se encubó a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante siete días. Al iniciar los diferentes experimentos se comprobaron los postulados de Koch en plantas de Manzano (*Musa* AAB) y Gran Enano (*Musa* AAA) obtenidas mediante propagación *in vitro* y aclimatizadas en los canteros del área de aclimatización del Centro de Bioplantitas.

Material vegetal. Los cultivares de banano se suministraron por el Banco de Germoplasma de Banano del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Previamente clasificados en resistentes o susceptibles a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 por Rodríguez-Nodals (1991). También se han referido en la literatura científica por Pérez, *et al.* (2003).

Las muestras foliares (hojas) de banano se tomaron de plantas de ocho a nueve meses de plantadas en los canteros del área de aclimatización del Centro de Bioplantitas. Las labores agrotécnicas al cultivo se realizaron según lo establecido por el Instructivo Técnico del Plátano del Ministerio de la Agricultura de Cuba (INIVIT, 2007). En los ensayos de actividad biológica del filtrado de cultivo, se usaron como referencia plantas de Manzano (*Musa* AAB)

y Gran Enano (*Musa AAA*) cultivares susceptible y resistente a la raza 1 del patógeno *in vivo*, respectivamente.

Filtrado de Cultivo (FC). Para obtener el filtrado de cultivo en medio líquido de la cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* correspondientes a la raza 1 GCV [01210] (Foc1) se tomaron discos de micelio de 8 mm de diámetro próximos a la periferia de la colonia crecida en placas de Petri con PDA. Luego se añadieron a 100 mL de medio de cultivo Caldo Czapek con ligeras modificaciones en su formulación [Glucosa (20 g), KCl (0,5 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g), NaNO_3 (2 g), H_2O destilada (1000 mL) a pH 5,5] en frascos de 250 mL de capacidad.

Los frascos se incubaron en condiciones estáticas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, y un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. El FC se colectó a los 15 días a partir de la inoculación del hongo en el medio de cultivo. Según Portal, *et al.* (2017) con este se logran diferenciar cultivares susceptibles y resistentes a la enfermedad.

El medio de cultivo líquido se filtró a través de cuatro capas de gasa y luego por papel de filtro Whatman No. 1 (Whatman plc., UK). El filtrado de cultivo del hongo se centrifugó a 8000-g durante 20 minutos en una centrifuga Heal Force[®], modelo Neofuge 15R, para eliminar los restos de micelio y conidios. El FC se concentró al 80% de su volumen inicial por rotoevaporación a presión reducida a 45°C (Heidolph, Alemania). Con la finalidad de concentrar las moléculas elicitoras presentes en el filtrado crudo del hongo. El FC se conservó a 4°C hasta su utilización en el bioensayo de punteadura en hojas.

Bioensayo de punteadura. Basado en su simplicidad y reproducibilidad, descrito por (Companioni, *et al.*, 2003). Las hojas de banano, de plantas de 8-9 meses de edad, de los cultivares susceptible y resistente a la enfermedad se colectaron y se trasladaron de forma inmediata al laboratorio de Interacción. Luego, se lavaron durante 20 minutos con

detergente comercial, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron con papel de filtro. Se realizaron incisiones con una aguja estéril en el limbo de las hojas (separadas a 1 cm entre ellas). Las heridas en las hojas fueron cubiertas con 5 μL de la muestra a ensayar (filtrado de cultivo del hongo).

Las hojas inoculadas se incubaron a $28\pm 2^\circ\text{C}$, $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (intensidad lumínica), fotoperíodo de 14 horas y 70% de Humedad Relativa durante 48 horas. Transcurrido el tiempo se determinó el área de la lesión elíptica. El medio de cultivo líquido sin inocular, se incubó y se concentró en iguales condiciones que el filtrado de cultivo, se utilizó como tratamiento control.

Cada tratamiento contó con tres hojas por cultivar ensayado. Se realizaron 16 heridas por hoja por muestra, distribuidas en cuadrículas de 4×4 . Se realizaron en total 48 repeticiones por cultivar para cada tratamiento ($n= 48$).

Se utilizó la fórmula de cálculo del área de una elipse para calcular el área de la lesión (clorosis o necrosis alrededor del punto de inoculación del FC) (ecuación 1):

$$A = \frac{\pi \times a \times b}{4} \quad (\text{ec.1})$$

Dónde:

A = Área de la elipse (mm^2)

$\pi = 3.14$

a = Semi-eje mayor (mm)

b = Semi-eje menor (mm)

En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el utilitario Statistical Package for Social Sciences (SPSS para Windows, versión 12 (Pérez, 2005)). Después de chequear el ajuste de los datos a la distribución normal (Kolmogorov- Smirnov, $p \leq 0,05$) y la homogeneidad de varianza (Levene, $p \leq 0,05$), se utilizaron pruebas paramétricas (Anova de un factor, HDS de Tukey, prueba de rangos múltiples de Duncan, prueba t-Student por pares, $p \leq 0,05$) y no paramétricas (Kruskal Wallis, Student Newman Keuls, $p \leq 0,05$).

El diseño experimental que se utilizó se describe en cada experimento. Las figuras en el acápite de resultados y discusión incluyen la información de las pruebas estadísticas que se realizaron en cada caso.

3.1 Determinación de la activación de las rutas del ácido salicílico y el ácido jasmónico en plantas de banano inoculadas con el filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

El desarrollo de la investigación se basa en las dos rutas de defensas descrita en plantas: la del Ácido salicílico (SA) y la del Ácido jasmónico (JA). Los candidatos génicos se seleccionaron de acuerdo al papel que tienen en las distintas rutas.

Para la determinar la activación de los genes claves, se utilizó el bioensayo de punteadura (Companioni, *et al.*, 2003), descrito en el acápite de generalidades de los experimentos. Luego, se aplicó el filtrado de cultivo de Foc1 con efecto elicitor en las hojas sueltas de bananos susceptibles y resistentes al marchitamiento por *Fusarium*. Las hojas de bananos se colectaron a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos posteriores a la inducción (mpi). En ambos grupos de plantas ensayadas, Manzano (susceptible) y Gran Enano (resistente), se trataron los controles con H₂O (solvente del elicitor) para cada tiempo evaluado (calibrador). Las hojas se sumergieron en nitrógeno líquido y posteriormente se conservaron a -70°C hasta el momento de la extracción del ARN total.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc. Se utilizó una modificación del método de CTAB (Li, *et al.*, 2013a) para la extracción del ARN total de las hojas de banano. Se tomaron 5 g de tejido vegetal y se trituraron en nitrógeno líquido, el polvo fino se mezcló con 20 mL de una solución tampón CTAB (3% CTAB, 2% PVP, 2 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris pH 8,0, 2% β -mercaptoetanol) y se incubó a 65°C durante 20 minutos. Al extracto se le adicionaron 0,6 volúmenes de cloroformo. Se homogenizó con golpe de vortex y se realizó la centrifugación a 12 000 g por 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se realizó la extracción nuevamente con igual volumen de cloroformo. El sobrenadante se mezcló con 0,5 volumen de 12 M LiCl y se incubó a -20°C durante 2 horas.

El ARN se precipitó por centrifugación a 12 000 g por 15 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió en 1 mL de NaCl 0,2 M. La solución de ARN se extrajo secuencialmente con igual volumen de fenol saturado en agua (pH 4,2) y cloroformo. El ARN se precipitó mezclando la solución con tres volúmenes de etanol y se mantuvo en hielo durante 30 minutos antes de centrifugar a 14 000 g durante 20 minutos a 4°C.

Luego de lavar el precipitado con EtOH 75%, fue disuelto en 50 μ L de agua libre en RNasa. El ADNc fue subsecuentemente sintetizado a partir de las muestras de ARN libre de ADN por random hexamer primering (Fermentas Life Sciences, Hanover, MD), usando el kit de síntesis de cadena de ADNc acorde con las instrucciones del fabricante (Promega, USA). Los ADNcs se analizaron para determinar la contaminación de ADN genómico por PCR, se utilizó el primer específico de Actina y los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa 2%, y las bandas se tiñeron con bromuro de etidium.

RT-PCR cuantitativo. Para el desarrollo del PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) se utilizó el LightCycler® 480, placas de PCR de 384-celdas y el Master kit LightCycler® 480 SYBR Green I (Roche Diagnostics, Germany). Se siguieron las instrucciones del fabricante.

Se realizaron 3 repeticiones para cada una de las reacciones. Cada una de ellas consistió en un 1 μ L del molde diluido (1/10), 1 mM de cebadores, y 5 μ L del Master kit Lightcycler® 480 SYBR-Green I. El volumen de reacción se ajustó a 10 μ L con agua libre de nucleasa. Las reacciones control sin el molde (NTC) contenían agua en lugar del molde de ADNc.

El programa de ciclos consistió de una fase inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, una fase de amplificación de 45 ciclos, cada uno consistente de un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 segundos, anillamiento a 63°C durante 5 segundos y extensión a 72°C durante 10 segundos. Los productos de PCR individuales se analizaron por el punto de fusión durante el cual las muestras se calentaron desde 65°C por 10 segundos hasta 95°C y se evaluó el decline en las señales fluorescentes de cada muestra individual.

La expresión de los genes se normalizó, para lo cual se utilizó el gen de actina como referencia interna y relativa a los niveles de transcripción en los controles tratados con H₂O (solvente del elicitor) para cada tiempo evaluado (calibrador). Se utilizó la fórmula de la expresión relativa para el análisis de las veces de cambio en la expresión de los genes (ecuación 2)

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad \text{(ec 2)}$$

Dónde:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ gen en cuentión} - \Delta Cq \text{ gen de referencia}$$

El ARN del gen *actina* se utilizó como control endógeno. Las secuencias de los cebadores usados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores usados para los estudios de expresión en hojas de bananos (Manzano y Gran Enano).

GEN	Dirección	Secuencia de oligonucleótido (5'-3')	Tamaño del producto PCR bp	Referencia
ACTINA	Sentido	GAGAAGATACAGTGTCTGGA	231	Hubert, <i>et al.</i> (2008)
	Antisentido	ATTACCATCGAAATATTTAAAAG		
NPR1	Sentido	GATAAGGCTATGGTGGGAAGA	555	Zhao, <i>et al.</i> (2013)
	Antisentido	CGCCCTAGTTAGTCTCCTACAT		
PR1	Sentido	TCCGGCCTTATTTACATTTC		van der Berg, <i>et al.</i> (2007)
	Antisentido	GCCATCTTCATCATCTGCAA		
SOD	Sentido	CCGAGGTTCTCTTCACTTCATCC		Li, <i>et al.</i> (2011)
	Antisentido	GAGTTGCAGCCGTTGGTGGTATC		
CAT	Sentido	ATGCAGAGAGATTCCCCATTCC		Li, <i>et al.</i> (2011)
	Antisentido	CTTGCCTATCAGGTGCCCAGGT		
PAL	Sentido	CCATCGGCAAACATCATGTTC	150	Paparau, <i>et al.</i> (2007)
	Antisentido	GTCCAAGCTCGGGTTTCTTC		
MYC2	Sentido	TGGTATGGAAGCCGCTGGTA	263	Zhao, <i>et al.</i> (2013)
	Antisentido	TCTGCTGGAATGTGCTGAGG		
AOC	Sentido	AGAACTACACCAACTGACCACG	158	Zhao, <i>et al.</i> (2013)
	Antisentido	GCATAACTAAGAGCAATGAAGC		

3.2 Evaluación del efecto de Actigard y el Biojas en la inducción de la resistencia del cultivar Manzano frente al filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1

Dos rutas de defensas se han descrito en plantas: Ácido salicílico (SA) y Ácido jasmónico (JA). En el presente acápite se evalúa el efecto del Actigard (ingrediente activo: ácido salicílico) y el Biojas (ingrediente activo: ácido jasmónico) en la inducción resistencia de las plantas de Manzano (cultivar susceptible).

Las plantas sembradas en los canteros del área de aclimatización del Centro de Bioplantas se trataron con Actigard (6; 12 y 18 g L⁻¹) y de Biojas (0,5; 1,0; 1,5 ml L⁻¹) diluidos en agua. Se asperjaron las plantas hasta visualizar un goteo del producto por las hojas. Luego de 24

horas de exposición de las plantas a los inductores se cortaron la segunda y la tercera hoja (hojas fisiológicamente activas).

Se llevaron al laboratorio, se lavaron con agua destilada estéril y secaron. Se realizó el bioensayo de punteadura (Companioni, *et al.*, 2003). Las heridas de las hojas se cubrieron con 5 µl del filtrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 colectado a los 15 días de crecimiento del hongo en medio de cultivo líquido (Portal, *et al.*, 2017). Las plantas de Manzano y Gran Enano asperjadas con agua se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Se realizó un experimento para determinar el efecto combinado de las concentraciones de Actigard y Biojas con las que se alcanzó la mejor protección de las plantas susceptibles, resultante del experimento anterior. Las plantas se asperjaron con la mezcla de compuestos. La segunda y tercera hoja se cortaron, se llevaron al laboratorio y se procedió de igual forma al experimento anterior.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO PARA DETERMINAR EL EFECTO DEL
ACTIGARD Y EL BIOJAS EN LA INDUCCIÓN DE LA RESISTENCIA EN PLANTAS



Área de
aclimatización

↓
Asperjar

Actigard (6; 12 y 18 g L⁻¹)
Biojas (0,5; 1,0; 1,5 ml L⁻¹)
Actigard + Biojas

↓
Cortar

2 ó 3 hoja/planta
24h Méndez *et al.*, 2010

↓
Lavar

Biensayo de punteadura



Companioni *et al.*, 2003

- Incisiones a 1 cm
- 5 µl de FC, 48 punteados en cuadrículas de 4x4

↓
Incubar 48h

Determinar área de la lesión elíptica

$$A = (\pi \times a \times b) / 4$$

Dónde: A = Área de la elipse
a = Semi-eje mayor (mm)
b = Semi-eje menor (mm)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la activación de las rutas del ácido salicílico y el ácido jasmónico en plantas de banano inoculadas con el filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Una de las primeras respuestas de la planta al ataque de un patógeno es la activación de las rutas del ácido salicílico y la del ácido jasmónico. Generalmente el ácido salicílico (SA) activa la respuesta contra patógenos biótrofos mientras que el ácido jasmónico (JA) en combinación con el etileno responde ante patógenos necrótrofos (Glazebrook, 2005; Di, *et al.*, 2016). En el caso del banano no se conoce el papel que juegan estos reguladores en la defensa contra Foc.

Por esa razón se decidió estudiar la expresión de un grupo de genes que normalmente se activan por el SA o el JA y constituyen genes marcadores de estas rutas. El gen *npr1* (nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1) es factor de transcripción y regulador positivo de la expresión de otro gen marcador de la ruta del SA, el pathogenesis-related proteins 1 (*pr1*). Los niveles de expresión relativa del gen *npr1* en respuesta a la aplicación del filtrado de cultivo (FC) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (Foc1) se muestran en la figura 1.

Durante los primeros 60 minutos de exposición de los tejidos de las plantas de banano a la acción de las moléculas elicitoras presentes en el filtrado de cultivo (FC) de Foc1, en el cultivar Manzano solo se detectó diferencias significativas a los 45 minutos posteriores a la inoculación. Se detectaron niveles de expresión equivalentes al doble de los niveles constitutivos del gen en el clon Manzano con respecto al calibrador.

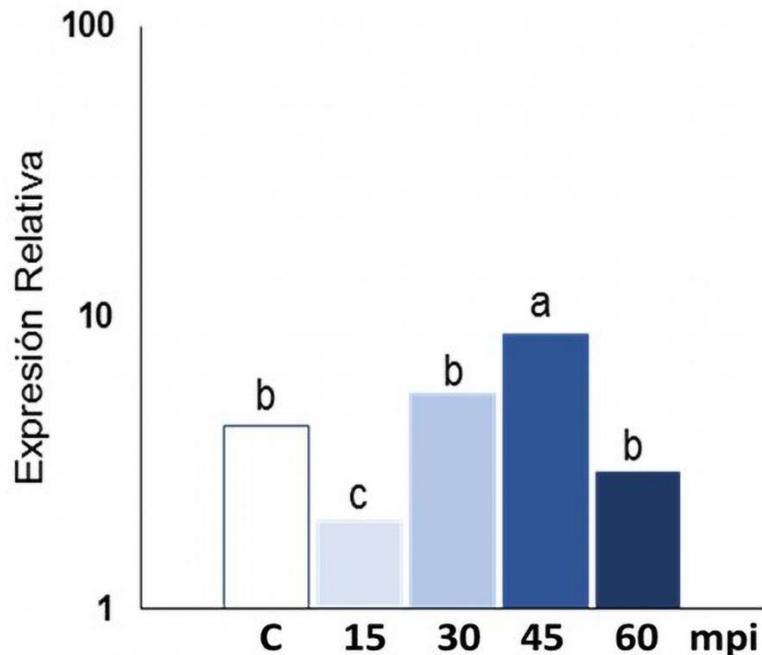


Figura 1. Niveles de expresión relativa del gen nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1 (*npr1*) en respuesta a la aplicación del filtrado de cultivo (FC) de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Manzano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción por el FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n = 3$). $ET_{Mz} = 3.47$

La figura 2 muestra que el cultivar Gran Enano (resistente) se registró un incremento de expresión relativa del gen con diferencias significativas de más de 2 veces a los 15 minutos posteriores a la inoculación con el filtrado de cultivo y más de 40 veces a los 30 minutos en comparación con el calibrador. A los 45 mpi los niveles de expresión del gen fueron equivalentes a su expresión constitutiva. A los 60 minutos en ambos cultivares se detectaron niveles basales de expresión del gen.

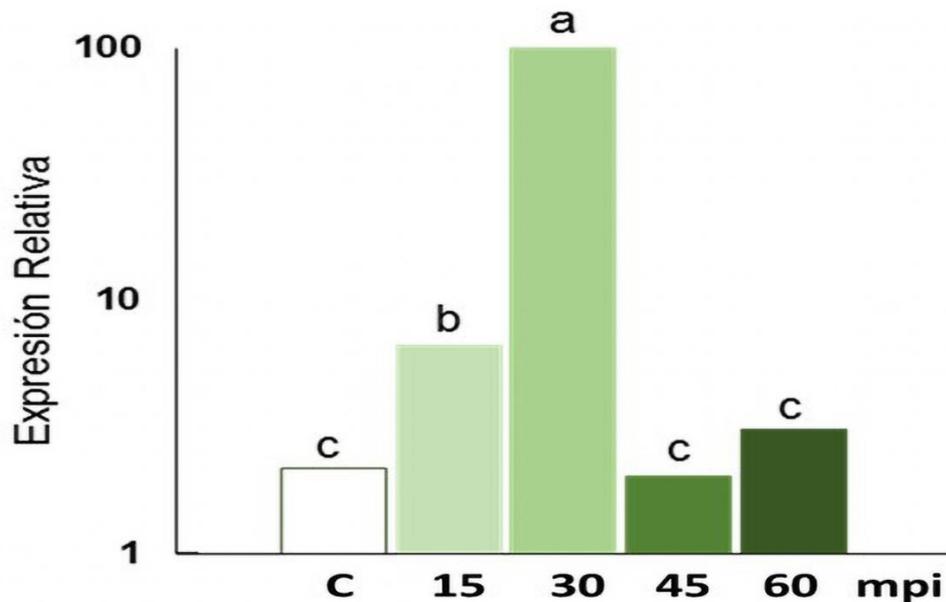


Figura 2. Niveles de expresión relativa del gen nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1 (*npr1*) en respuesta a la aplicación del filtrado de cultivo (FC) de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Gran Enano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción por el FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n = 3$). $ET_{GE} = 3.15$

En los resultados descritos en este trabajo, la elicitación directa con moléculas presentes en el FC de Foc1, en lugar del patógeno, se detectó una respuesta más débil y retardada en la inducción del gen *npr1* para el clon susceptible ensayado. En el caso del cultivar resistente se observó que la respuesta manifestó incrementos de 2 hasta 40 veces mayores en los niveles de expresión del gen y se detectó una respuesta más temprana con respecto al cultivar Manzano.

En plantas salvajes, el gen *npr1*, es un regulador esencial en la ruta del ácido salicílico. Los cambios redox mediados por ácido salicílico en células de *Arabidopsis* regulan tanto el funcionamiento de NPR1 como su unión a TGA1, factor de transcripción a nivel de núcleo, que activa la expresión de PR (proteínas relacionadas a la patogénesis), la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR). Aunque la Resistencia Sistémica Inducida (ISR, siglas en inglés) es independiente de SA, ésta es dependiente de *NPR1*, indicando que las rutas de resistencia dependientes de JA/ET y SA comparten al menos un componente regulatorio clave (Verma, *et al.*, 2016) y los efectos antagónicos del SA en la señalización del JA requiere *npr1*.

En estudios de mutantes de *Arabidopsis thaliana*, defectuosos del gen *npr1* no expresan la proteína PR-1 por eso es conocido como noexpressor of pathogenesis-related proteins 1. Estos mutantes son susceptibles a varias enfermedades porque no se activa la ruta del ácido salicílico en la defensa de la planta (Di, *et al.*, 2016).

En el experimento, al detectar mayores niveles de expresión del gen *npr1* en plantas resistentes de banano puede indicar que la ruta del ácido salicílico funciona frente al ataque de *Fusarium oxysporum*. Varios autores han observado influencias positivas de *npr1* en la resistencia de las plantas a diferentes especies de *Fusarium*. Shah, *et al.* (1997) confirmó que *npr1* estuvo involucrado en la resistencia a la Fusariosis de la espiga en trigo.

Berrocal-Lobo, *et al.* (2004) encontraron un incremento en la susceptibilidad de mutantes de *Arabidopsis* para el gen *npr1* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y a *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Por otra parte, Lin, *et al.* (2004) informó una disminución de la susceptibilidad del tomate (*Solanum lycopersicum*) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Otros autores han informado resultados similares (Kuai, *et al.*, 2015 ; Withers, *et al.*, 2016) . Por tanto, *npr1* es un regulador positivo de la expresión de genes PR inducidos

por SAR. Esto justificaría la utilización de productos basados en ácido salicílico para combatir la marchitez del banano.

Así mismo, la estimulación génica de los niveles de ácido salicílico además de potenciar la expresión de proteínas PR, también regula positivamente la Respuesta Hipersensible (HR) en conjunto con especies reactivas del oxígeno. La respuesta hipersensible, se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas. Las lesiones aparecen en el mismo sitio de infección por la interacción directa con un patógeno o por la elicitación de moléculas presentes en el filtrado de cultivo. Estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada o reacción hipersensible (Makandar, *et al.*, 2010).

A pesar de que HR es un mecanismo efectivo que produce una reacción de resistencia casi absoluta, aún no existe consenso que defina si la HR es directamente responsable de la resistencia, al privar de tejido vivo y nutrientes al patógeno, o si más bien su acción está basada en la acumulación de compuestos dañinos que simultáneamente matan al patógeno y a las células hospederas (Heath, 2000). Esta es la razón por lo que se explica que la ruta de defensa del ácido salicílico protege a la planta de microorganismos biótrofos.

La reacción hipersensible además está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o SAR (Ryals, *et al.*, 1996).

La Figura 3 muestra la expresión relativa del gen *pr-1* en el cultivar Manzano. La sobre-expresión del gen *pr-1* está relacionada con la expresión relativa del gen *npr1*. Los niveles de ARNm de PR-1 (*pathogenesis-related proteins-1*) durante los primeros 15 mpi no mostraron diferencias significativas con respecto al calibrador. Sin embargo, la expresión

se elevó 8 veces en este clon a los 30 mpi en comparación con el calibrador. Luego los niveles de expresión disminuyen durante los 45 y 60 mpi y no muestran diferencias significativas con respecto al calibrador.

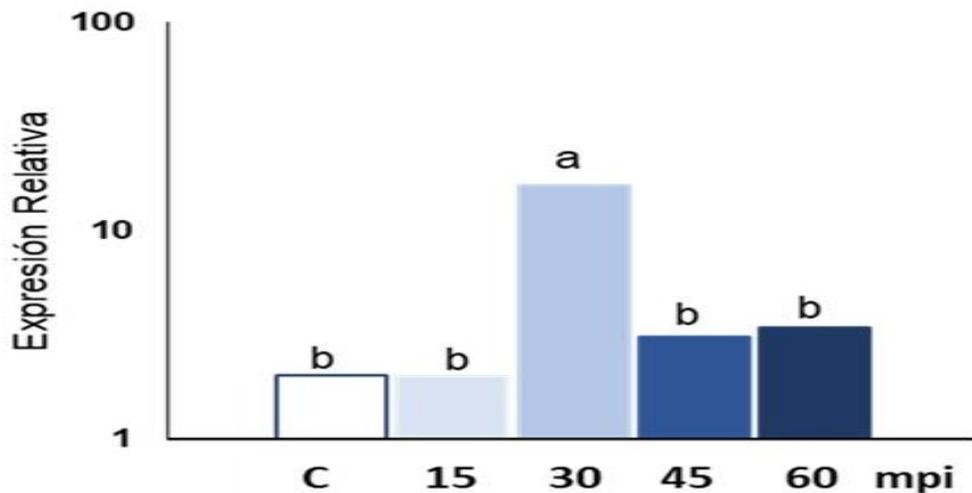


Figura 3. Niveles de expresión relativa del gen pathogenesis-related proteins-1 (*pr1*) en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Manzano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n = 3$). $ET_{MZ} = 3.32$

En caso del cultivar Gran Enano la expresión relativa del gen *pr-1* no mostró diferencias significativas con respecto al calibrador a los 15 mpi, sin embargo, aumentó más de 20 veces a los 30 mpi en comparación con el calibrador (Figura 4). La sobre-expresión marcada a los 30 mpi en el cultivar resistente se puede relacionar con la detección de la sobre-expresión de NPR1 en el mismo tiempo. Se manifiesta la correlación existente entre el regulador NPR1 con las proteínas relacionadas con la patogénesis y la función en la

célula de PR-1, que se ha encontrado en la pared celular y en la capa externa de las células lo que explica su papel en la protección de los cultivares resistentes.

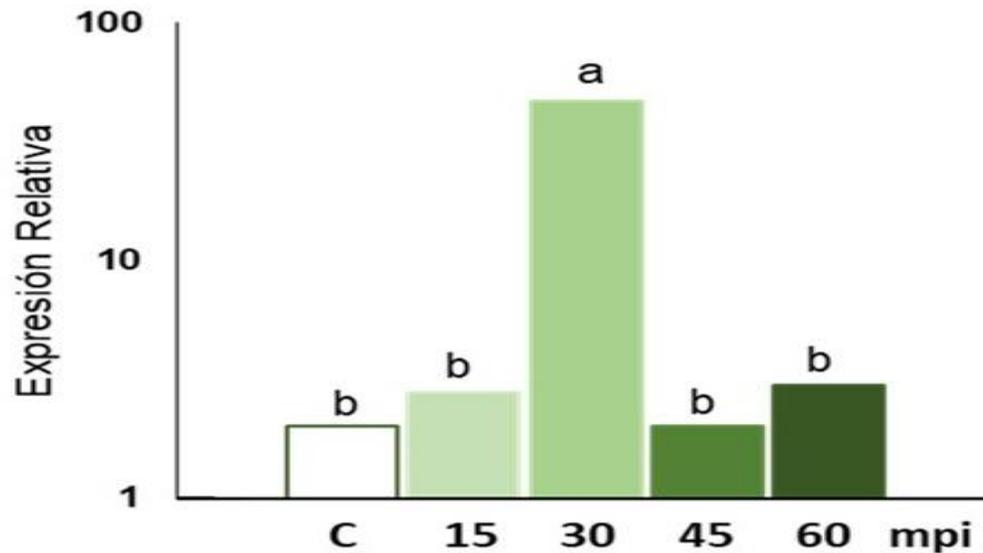


Figura 4. Niveles de expresión relativa del gen pathogenesis-related proteins-1 (*pr1*) en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Gran Enano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n = 3$). $ET_{GE} = 3.21$

Santén, *et al.* (2005) informa la detección de las PR reforzando la pared celular, esto sugiere su papel en la prevención de la dispersión del patógeno. Por tanto, se le ha definido como proteína inducida en respuesta al ataque de un patógeno (Van Loon, *et al.*, 2006). De hecho, plantas de trigo y arroz manipuladas genéticamente para sobre-expresar ciertas PRs demostraron ser más resistentes a los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea* respectivamente (Nishizawa, *et al.*, 1999).

En ambos cultivares los niveles de expresión del gen disminuyen a los 45 mpi sin mostrar diferencias significativas a los niveles de expresión a los 60 mpi con respecto al calibrador. Los niveles constitutivos detectados en el cultivar Manzano y en Gran Enano se compara con algunos estudios donde se han detectado las dos isoformas (debido a su origen químico denominadas ácidas y básicas) de las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) en tejido sano sin ningún estrés. Varias PRs aparecen en la madurez en plantas como papa y tabaco, durante la floración en órganos como raíz, semilla y flores y de manera constitutiva en hojas de frijol. La expresión constitutiva de PR1, PR2 y PR5 se han informado en algunas variedades de *Solanum* spp. (Vidhyasekaran, 2008).

Sin embargo, la baja expresión del gen durante los 45 y 60 mpi puede deberse a que como durante los 30 mpi en ambos cultivares se sobre-expresó el gen, pudiera existir acumulación de PR proteínas. Así mismo, la acumulación de las PR proteínas: antifúngicas, glucanasas y quitinasas actúan en defensa de la planta, directamente en células dianas del patógeno. Las cuales provocan la ruptura de la pared celular y la membrana citoplasmática de los microorganismos patogénicos durante la interacción. En esta investigación la inducción de respuesta es causada por el filtrado de cultivo constituido por moléculas elicitoras. Por tanto, la no detección de mecanismos de infección del patógeno por las células de las hojas podría ser una señal de retroalimentación de que no se sintetice más proteínas. A su vez, los niveles de expresión de los genes PR disminuirían en el tiempo.

La rápida activación transcripcional de genes relacionados con patogénesis (genes PR) se ve relacionada con la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR). La resistencia sistémica adquirida actúa en toda la planta y es alimentada por rutas de señalización que sensibilizan a la planta contra una gama de patógenos y en sitios que no han estado en contacto con el patógeno. SAR es dependiente de la ruta metabólica del ácido salicílico y su inicio se caracteriza por la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas a la

patogénesis (PR), tales como β -1,3-gluconasa (familia PR1), endoquitinasa (familia PR3) y proteínas ligadas a taumatina (familia PR5). Pegg, *et al.* (1982) plantearon que la inducción de β -1–3 gluconasa y quitinasa puede servir para inhibir Foc en banano.

En numerosos estudios se han encontrado que las proteínas PR se expresan en mayor proporción en el punto de infección, así como en los tejidos vegetales distales al sitio primario frente al ataque de patógenos como hongos y virus (Van Loon, *et al.*, 2006). Sus pesos oscilan entre 5 a 75 kDa, así, las proteínas de pesos inferiores a 10 kDa se denominan péptidos PR, también conocidas como péptidos antimicrobianos (AMP) (Thevissen, *et al.*, 2004; Carvalho, *et al.*, 2009)

Vidhyasekaran (2008) informa estudios de plantas transgénicas de *Arabidopsis* donde el ácido salicílico y proteínas relacionadas con la patogénesis se requirieron para aumentar la resistencia frente a la infección por patógenos.

El gen superóxido dismutasa (*sod*) también presentó niveles constitutivos de expresión en ambos cultivares ensayados a los 15 mpi. Con respecto al cultivar susceptible los niveles en la expresión se mantuvieron similares a los constitutivos durante todos los momentos de evaluación (Figura 5). No se evidenció un incremento en la inducción del gen en plantas inoculadas con el filtrado de cultivo y no existieron diferencias significativas comparadas con el calibrador.

En el cultivar resistente los niveles de expresión del gen se incrementaron más de 6 veces su valor constitutivo a los 30 minutos posteriores a la aplicación del FC de Foc1. Sin embargo, a los 45 minutos posteriores se apreció una disminución de los niveles de expresión. A los 60 mpi no existieron diferencias significativas con respecto a la expresión constitutiva comparada con el calibrador.

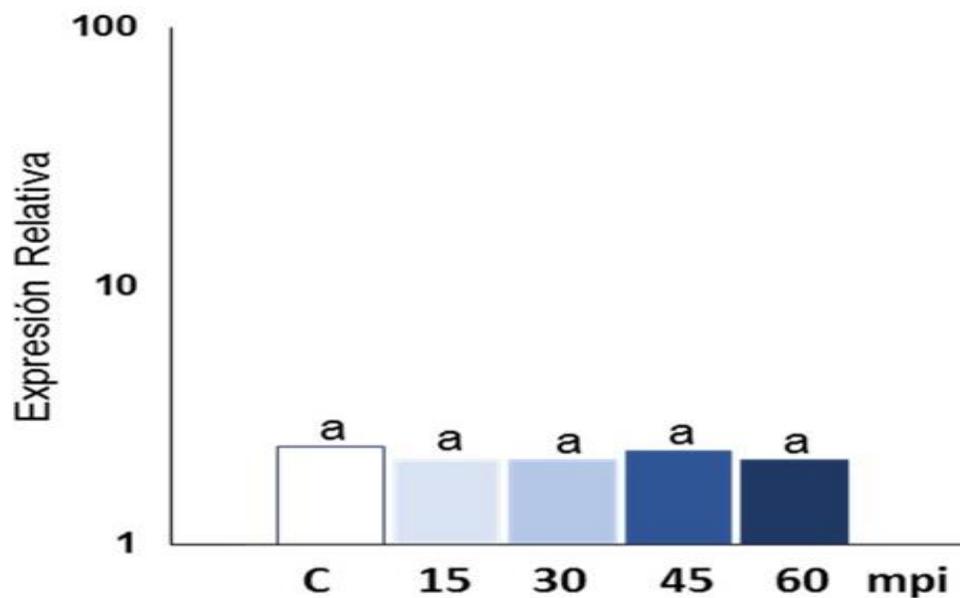


Figura 5. Niveles de expresión relativa del gen superóxido dismutasa (*sod*) en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Manzano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n=3$). $ET_{MZ}= 1.13$

Los resultados señalan que la expresión del gen disminuyó luego de los 30 mpi en los tiempos ensayados en el cultivar resistente Gran Enano (Figura 6). Sin embargo, el cultivar susceptible Manzano mostró una respuesta baja y sostenible en el tiempo evaluado. Esto pudiera deberse a que en el cultivar Manzano no ocurre una explosión oxidativa tan marcada como en el cultivar resistente.

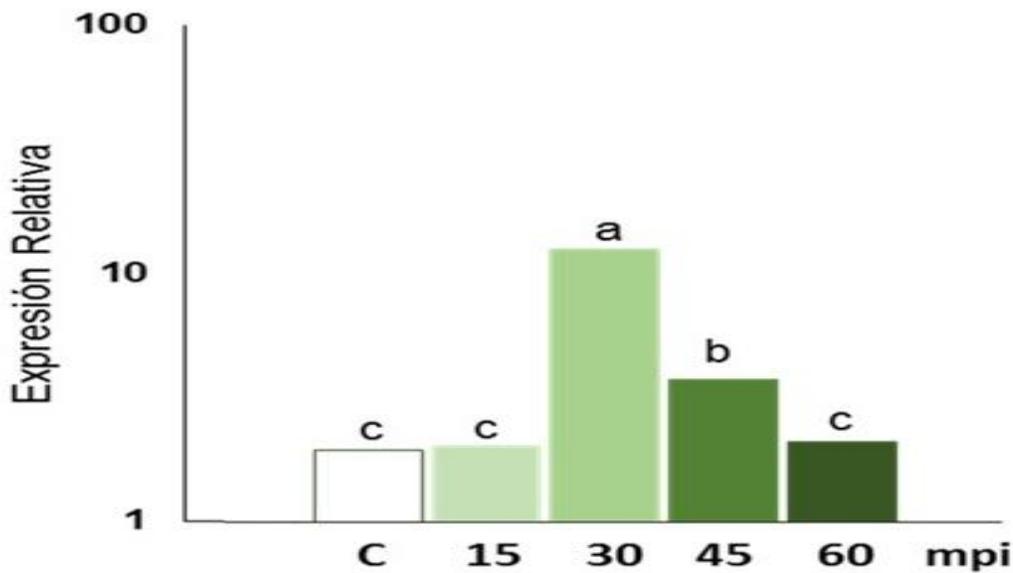


Figura 6. Niveles de expresión relativa del gen superóxido dismutasa (*sod*) en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Gran Enano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n=3$). $ET_{GE}=2.05$

Por tanto, los compuestos como los aniones superóxido (O_2^-) producidos por NADPH oxidasas transmembrana se encuentran en menor concentración en el cultivar susceptible que en el cultivar resistente durante la primera hora después de la inoculación. Se sabe que en plantas resistentes, luego de la percepción de un elicitador, se activan los canales de calcio que permiten la entrada al citoplasma de este catión, el calcio activa las NADPH oxidasas encargadas de producir el anión superóxido a partir de oxígeno molecular (Dubiella, *et al.*, 2013). En consecuencia, los niveles de expresión de *sod*, gen que codifica a la proteína

superóxido dismutasa encargada de reducir los aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son bajos en cultivar susceptible.

Se detectaron niveles constitutivos del gen *cat* para los dos clones analizados. En el clon susceptible se apreció una reducción en los niveles de expresión de este gen a los 45 y 60 mpi (Figura 7).

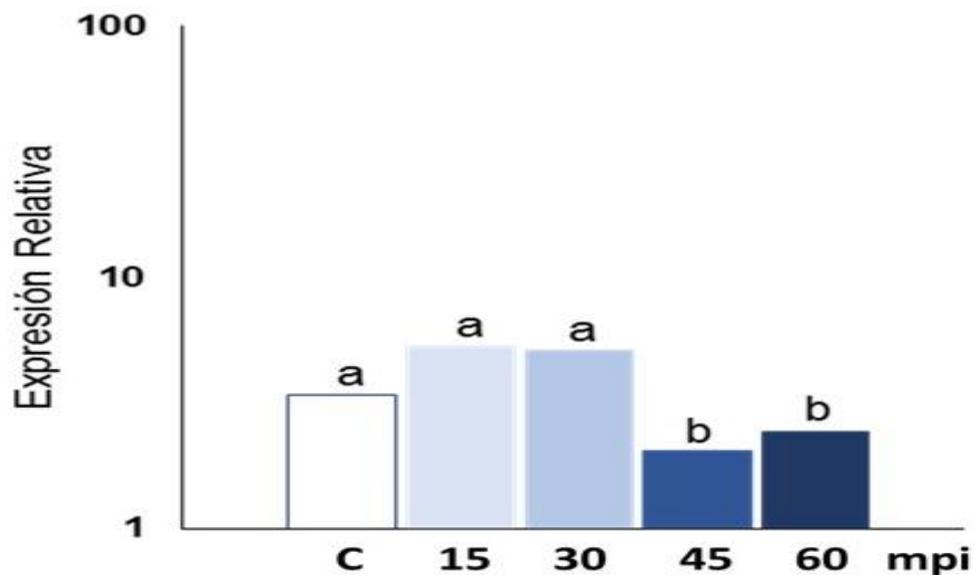


Figura 7. Niveles de expresión relativa del gen catalasa (*cat*) en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Manzano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n= 3$). $ET_{Mz}= 0.2$

En el clon Gran Enano se detectó un incremento 4 veces superior con las moléculas elicitoras durante los 30 mpi en comparación a sus niveles basales (Figura 8).

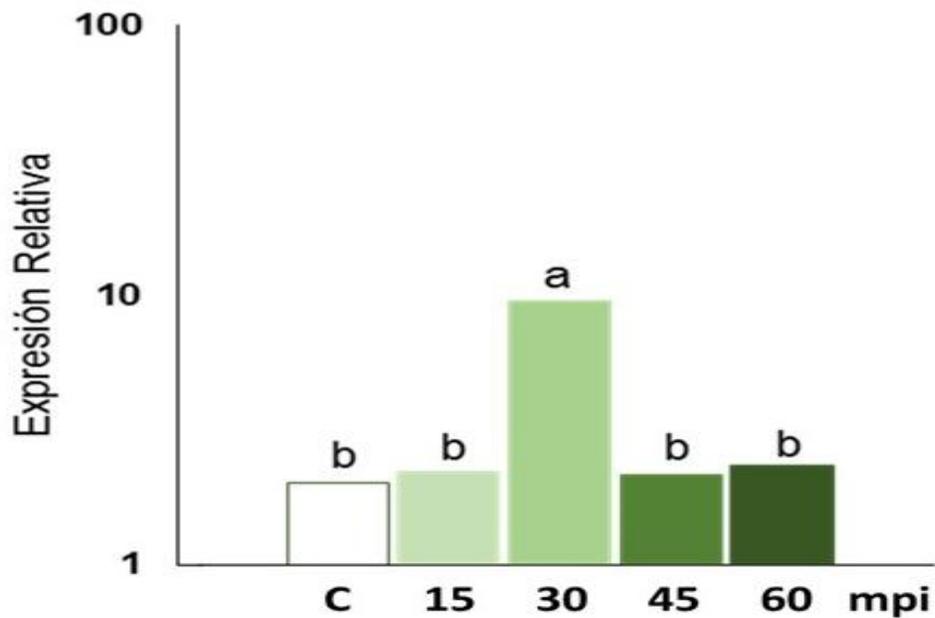


Figura 8. Niveles de expresión relativa del gen catalasa (*cat*) en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Gran Enano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n= 3$). $ET_{GE} = 1.12$

Los mayores niveles de expresión relativa del gen *cat* y *sod* en el cultivar resistente sugieren la importancia del papel de estas enzimas en la protección de las plantas de banano frente la invasión y colonización de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. La expresión del gen *cat* sugiere la presencia y acumulación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), molécula mensajera temprana en la cascada de señalización mediada por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La presencia de esta especie reactiva del oxígeno (ROS) se debe a la “explosión oxidativa” producto normalmente de la liberación de las reacciones metabólicas y el ataque de patógenos o elicitores que provocan un desequilibrio redox en el interior

celular. Ante un ataque por patógeno, además de molécula señalizadora, la acumulación de peróxido de hidrógeno también actúa directamente contra los microorganismos evitando su propagación por la planta debido a que el peróxido resulta tóxico para la gran mayoría de los microorganismos.

Sin embargo, el peróxido de hidrógeno también es altamente tóxico para las células de las plantas, por lo que altas acumulaciones provocan destrucción de proteínas necesarias para el mantenimiento de la homeostasis. Así la expresión del gen *cat* se relaciona con la expresión de *sod* debido a que la superóxido dismutasa representa la primera línea de defensa de las células frente al estrés oxidativo, ya que cataliza la conversión del radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Mientras que la catalasa enzima perteneciente a la categoría de las oxidoreductasas catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno, transformándolo en agua y oxígeno. Las actividades superóxido dismutasa y catalasa protegen no sólo de forma directa eliminando aniones superóxido y peróxido de hidrógeno, respectivamente, sino que también impiden la formación del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), la especie reactiva derivada del oxígeno con mayor poder oxidante.

En las figuras 6 y 8 se observó que tanto el gen que codifica para SOD, como para CAT se indujeron levemente en hojas del clon resistente a los 30 mpi. Li, *et al.* (2013c) detectaron niveles incrementados de SOD en un clon de banano resistente posterior a la inoculación con un aislado de Foc4.

van der Berg, *et al.* (2007) también detectaron que la expresión del gen *cat* fue significativamente incrementado en el clon de banano resistente a las 6 y 48 horas posteriores a la inoculación con un aislado de Foc. Consecuentemente, ellos sugirieron que la expresión de CAT en las raíces fue una respuesta temprana a la infección.

Las plantas se protegen de las infecciones por patógenos mediante una amplia gama de estrategias de defensa, lo cual incluye reforzamiento de la pared celular, síntesis de fitoalexinas y la expresión de genes relacionados con la defensa (Miedes, *et al.*, 2014). Estas respuestas están usualmente asociadas con una rápida y transiente producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 es una molécula mensajera temprana en la cascada de señalización activada por varios estímulos externos y ambientales (Marinho, *et al.*, 2014).

El desequilibrio oxidativo conduce a la inactivación de proteínas, a la oxidación de ácidos nucleicos y otras moléculas esenciales, durante el proceso de interacción planta - patógeno lo que representa una estrategia importante en la lucha contra las infecciones. Para competir con los radicales libres generados, los microorganismos patógenos se han visto obligados a desarrollar estrategias en un doble frente: por un lado, la protección frente a los radicales generados en su propio metabolismo y por otro, la defensa frente al contacto con estos radicales producidos por las células de las plantas.

Oliveira, *et al.* (2016) informaron que en el caso de las interacciones planta-patógeno, el agente oxidante no sólo elimina o inhibe el crecimiento de patógenos, sino también está ciertamente involucrado en la inducción de genes de defensa al patógeno, tales como, genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), genes que regulan la acumulación de compuestos fenilpropanoides y genes que codifican enzimas detoxificantes de especies reactivas de oxígeno, entre otros. Además, la actividad enzimática de CAT impide la acumulación de niveles autotóxicos de H_2O_2 en las células de la planta.

La interacción planta-*Fusarium oxysporum* (Fox) se ha estudiado en tomate. El-Khallal (2007) investigó la producción de ROS, principalmente H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$. Refiere en su estudio

el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en hojas de tomate en estados tardíos de la infección.

Hanaa, *et al.* (2011) también encontraron niveles incrementados de peroxidación lipídica y un marcado incremento en las actividades de enzimas defensivas antioxidantes, como la CAT y SOD en plantas de tomate en semillero. De este modo, la acumulación de O_2^- y H_2O_2 se ha considerado como un evento temprano en el reconocimiento planta-patógeno. La presencia de estos compuestos en el ambiente espacial y temporal son factores claves que deciden si la planta resiste a cierto patógeno.

De manera general cuando ocurre un daño en membrana provocado por un patógeno o aumenta las concentraciones de ácido salicílico debido a la acción de moléculas elicitoras presentes en el filtrado de cultivo. Ocurre así un desequilibrio redox provocado por especies reactivas del oxígeno. Se activa el gen que codifica a la enzima SOD. Aumenta las concentraciones de H_2O_2 , lo que ocasiona cambios redox en el citoplasma. Se favorece así que la proteína NPR1 que se localiza en el citoplasma y existe como un oligómero inactivo sea activada y penetre al núcleo donde interactúa con factores de transcripción TGA para inducir la expresión de los genes de defensa, activando por tanto SAR (Yi, *et al.*, 2014). Esto demuestra el entrecruzamiento que existe entre las distintas rutas de defensa, así como su relación con genes que codifican a proteínas asociadas al estrés oxidativo.

Los niveles de expresión del gen Fenilalanina Amonio Liasa (*pal*) en respuesta a la aplicación de las moléculas presentes en el FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 se muestran en la figura 9. Se apreciaron niveles constitutivos de este gen para ambos grupos de plantas. En las plantas susceptibles se elevaron 3 veces los niveles de expresión del gen a los 30 mpi. A partir de este momento, en el cultivar susceptible los niveles de expresión disminuyeron hasta no mostrar diferencias significativas con los niveles constitutivos del calibrador.

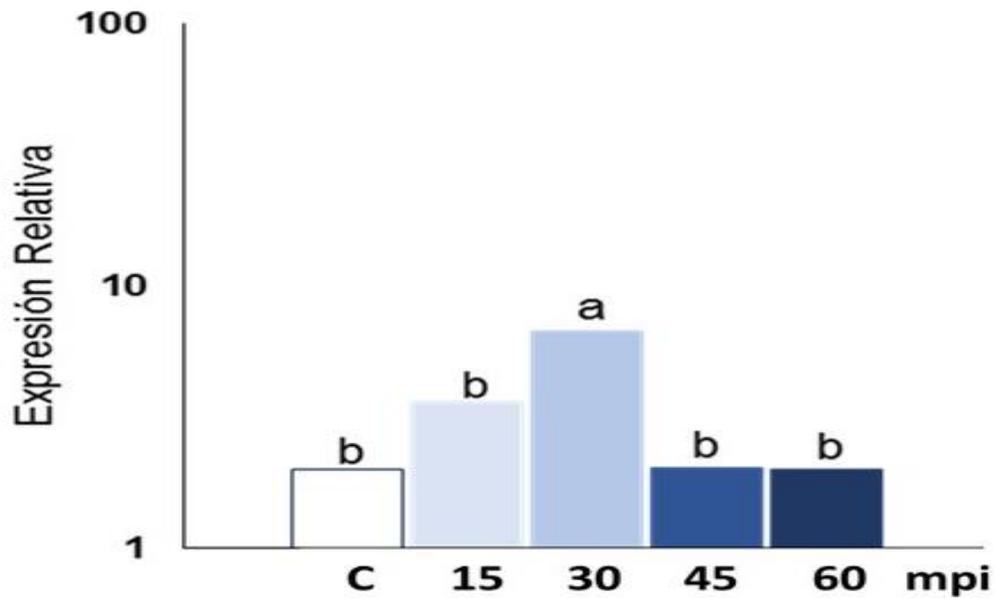


Figura 9. Niveles de expresión relativa del gen Fenilalanina Amonio Liasa (*pal*) en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Manzano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n= 3$). $ET_{MZ}= 1.47$

En la figura 10 se observó que en las plantas resistentes que los niveles de expresión del gen *pal* a los 30 mpi se elevaron en 35 veces en comparación con sus niveles constitutivos comparados con el calibrador. Sin embargo, en el cultivar resistente ocurrió una disminución de los niveles de expresión durante los 45 y 60 mpi en comparación con los niveles expresados durante los 30 mpi. No obstante, los niveles de expresión relativa del gen *pal* se mantuvieron 2 veces superiores en comparación con el calibrador durante los 45 y 60 mpi respectivamente.

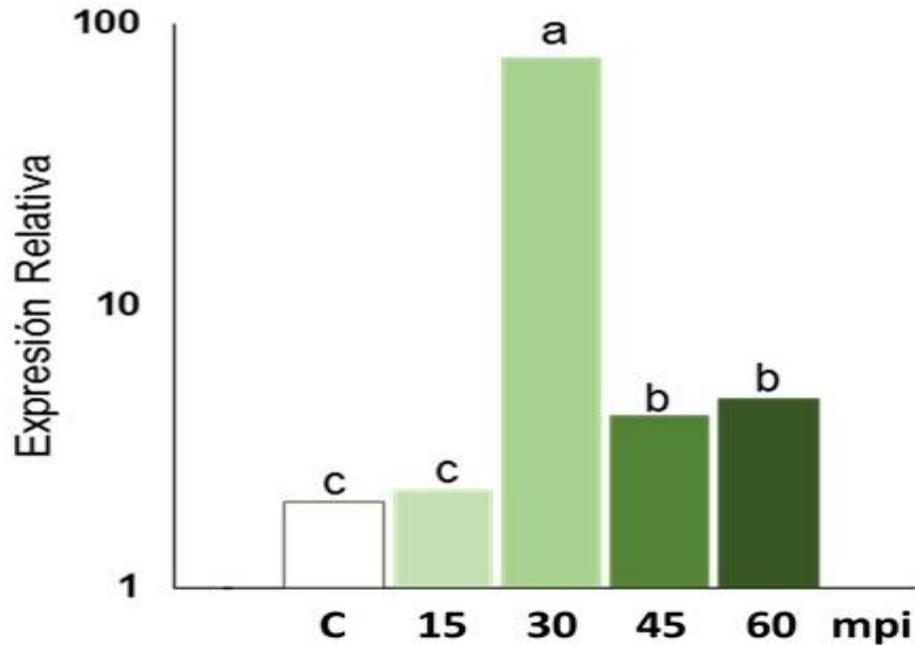


Figura 10. Niveles de expresión relativa del gen Fenilalanina Amonio Liasa (*pal*) en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Gran Enano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n = 3$). $ET_{GE} = 1.96$

Li, *et al.* (2013a) observaron que un gen que codifica para PAL también fue inducido posterior a la infección tanto por Foc1 como por Foc4 en un clon de banano resistente, mientras que Wang, *et al.* (2012) señalan que tanto la expresión de genes del metabolismo de fenilalanina, la biosíntesis fenilpropanoide, como la ruta biosintética del metabolismo del ácido alfa-linolénico fueron afectadas por la infección de Foc4.

La alta expresión génica de la fenilalanina amonio liasa PAL en el cultivar resistente Gran Enano indica que esta enzima, permite la formación de compuestos fenólicos en las plantas

lo que puede estar relacionado con la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. La respuesta de resistencia en bananos está basada en la habilidad de las plantas resistentes para producir fenoles, depósitos de lignina y el aumento de las enzimas implicadas en la consolidación de la pared celular. Los compuestos fenólicos juegan un importante papel en los procesos de resistencia contra enfermedades vasculares y está presente en el sistema tisular de bananos, algodón y papa y actúan activando las enzimas hidrolíticas del patógeno.

De acuerdo con diversos estudios en otros modelos planta-patógeno, enzimas involucradas como la fenilalanina amonio liasa (PAL), participan de manera determinante en la generación de compuestos fenólicos y estructuras de defensa. Es probable que su regulación coordinada durante el evento de la interacción contra patógenos sea clave en la activación de los mecanismos de defensa vegetales (Glazebrook, 2005). PAL es la enzima que, al catalizar la primera reacción de la ruta fenilpropanoide, se ha encontrado que puede regular la generación de los diferentes metabolitos obtenidos por esta vía biosintética (van der Berg, *et al.*, 2007; Usharani, *et al.*, 2016).

Li, *et al.* (2013a) también observaron que un gen que codifica para PAL y otro codificante de una peroxidasa aniónica formadora de lignina, se indujeron de manera similar entre uno y dos días posterior a la infección (más de 40 veces) tanto por Foc1 como por Foc4. En general, varios genes involucrados en la biosíntesis fenilpropanoide se indujeron por Foc4 (Li, *et al.*, 2013b). Adicionalmente, estos investigadores plantean que PAL está involucrada en la biosíntesis de fenilpropanoides, monolignanos y fitoalexinas, así como primera enzima en la vía de biosíntesis de SA en las plantas. Los genes que codifican para PAL son inducidos por una variedad de patógenos y sus metabolitos elicitores (Kim, *et al.*, 2014).

La inoculación de plantas de banano con un aislado incompatible de la raza 1 del patógeno indujo una protección sistémica frente a la infección por un aislado correspondiente a la

raza 4 en un intervalo de 10 días entre ambos tratamientos (Wu, *et al.*, 2013). En este intervalo se incrementaron las actividades de enzimas como fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), peroxidasa (PO, EC 1.11.1.7) y superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1). También se incrementó el contenido de SA en las raíces de las plantas de banano.

La figura 11 muestra la expresión relativa del gen *myc2*, factor de transcripción importante en la ruta del ácido jasmónico. En el cultivar susceptible Manzano, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de este gen comparadas con el calibrador para los 15 y 30 mpi con el FC respectivamente.

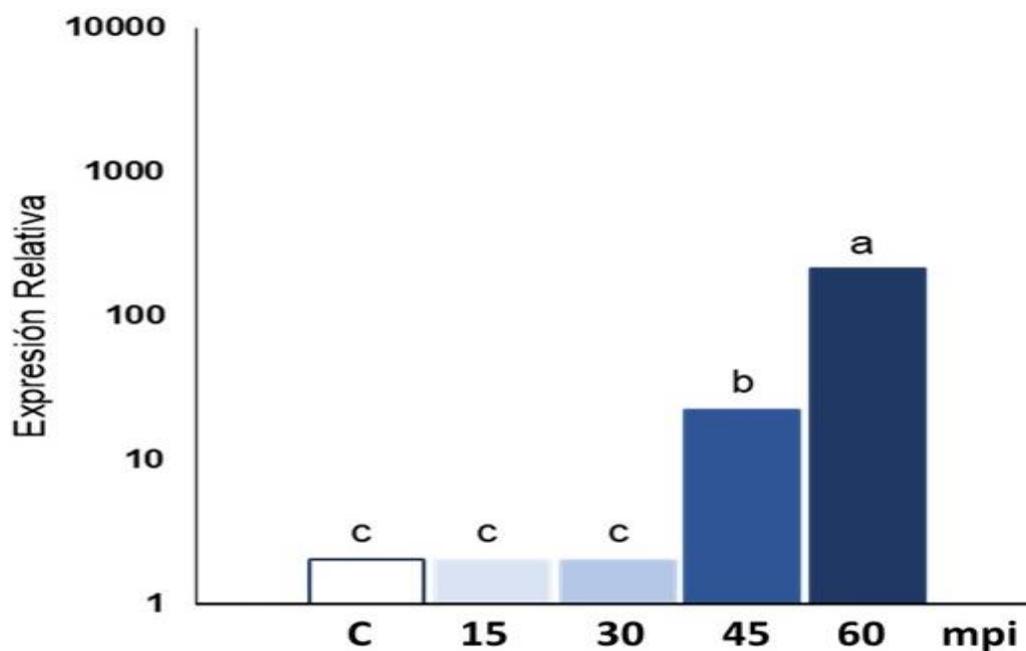


Figura 11. Niveles de expresión relativa del gen *myc2* en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Manzano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no poseen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n= 3$). $ET_{MZ}= 3.2$

La expresión del gen se incrementó en 10 veces y en más de 100 durante los 45 y 60 mpi respectivamente comparado con el calibrador.

En cuanto a la expresión relativa del gen *myc2* en el cultivar susceptible a los elicitores presentes en el FC, se observó un notable efecto retardado en comparación con la expresión relativa de los genes marcadores de la ruta del ácido salicílico (*npr1*, *pr-1*,) del mismo cultivar Manzano. La inducción tardía de los genes en el cultivar susceptible puede relacionarse con la poca resistencia que el mismo muestra ante el ataque del patógeno.

El gen *myc2* es el primer factor de transcripción conocido que interactúa directamente con las proteínas JAZ (*jasmonate-zim domain*) y activa la transcripción de los genes de respuesta temprana a JA (Wasternack, *et al.*, 2013). La degradación de las proteínas JAZ conduce a la des-represión de los factores de transferencia (TFs) que inician la activación de la expresión génica dependiente de JA, la supresión de las respuestas de SA y con ello la susceptibilidad de las plantas a microorganismos biotrofos (Gimenez-Ibanez, *et al.*, 2016) o la resistencia a los necrótrofos.

En el cultivar resistente Gran Enano (Figura 12), se detectaron niveles de expresión del gen *myc2* en un incremento de 80 veces y en más de 3000 veces superiores a los 15 y 30 minutos post inducción con el FC respectivamente, comparado con el calibrador. A los 45 y 60 mpi los niveles de expresión de *myc2* disminuyeron a niveles constitutivos sin mostrar diferencias significativas con respecto al calibrador.

Sin embargo, en el cultivar resistente Gran Enano se activaron los genes 15 minutos posteriores a la inoculación del filtrado de cultivo. La detección temprana de las moléculas elicitoras presentes en el filtrado conlleva a una cascada de señalización, y luego la activación del factor de transcripción *myc2*. Los resultados indican que la ruta del ácido jasmónico está involucrada en la resistencia manifestada en cultivar resistente.

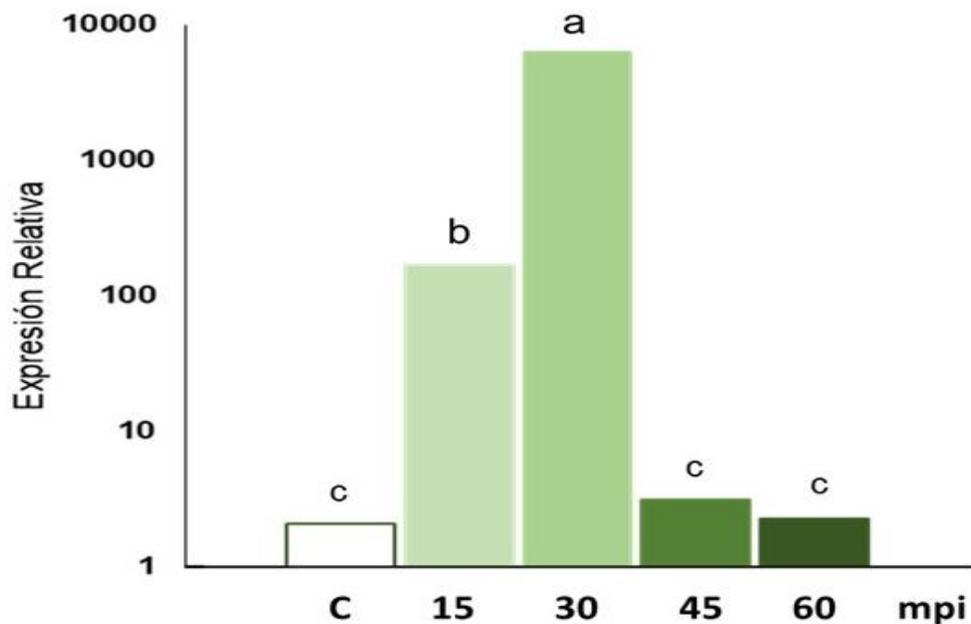


Figura 12. Niveles de expresión relativa del gen *myc2* en respuesta a la aplicación del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Gran Enano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc1). Barras con letras iguales indican que no poseen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n= 3$). $ET_{GE} = 2.96$

Bai, *et al.* (2013) analizaron la transcripción y expresión de perfiles de resistencia en los cultivares de banano Yueyoukang 1 y Brasileño, después de infectar con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4. La variedad Yueyoukang 1 tiene mecanismos de defensa más rápidos con respecto al Brasileño. La expresión de genes de defensa se relacionó con proteínas NBS-LRR, proteínas PR y factores de transcripción, lo que indica que estos genes juegan un papel importante en la defensa de los bananos contra la infección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4.

La figura 13 muestra la expresión relativa del gen aleno oxido ciclasa (*aoc*). Los niveles de expresión del gen en el cultivar Manzano durante los 15, 30 y 45 mpi no mostraron diferencias significativas comparadas con el calibrador. A los 60 mpi se evidenció una expresión 1000 veces superior comparado con el calibrador.

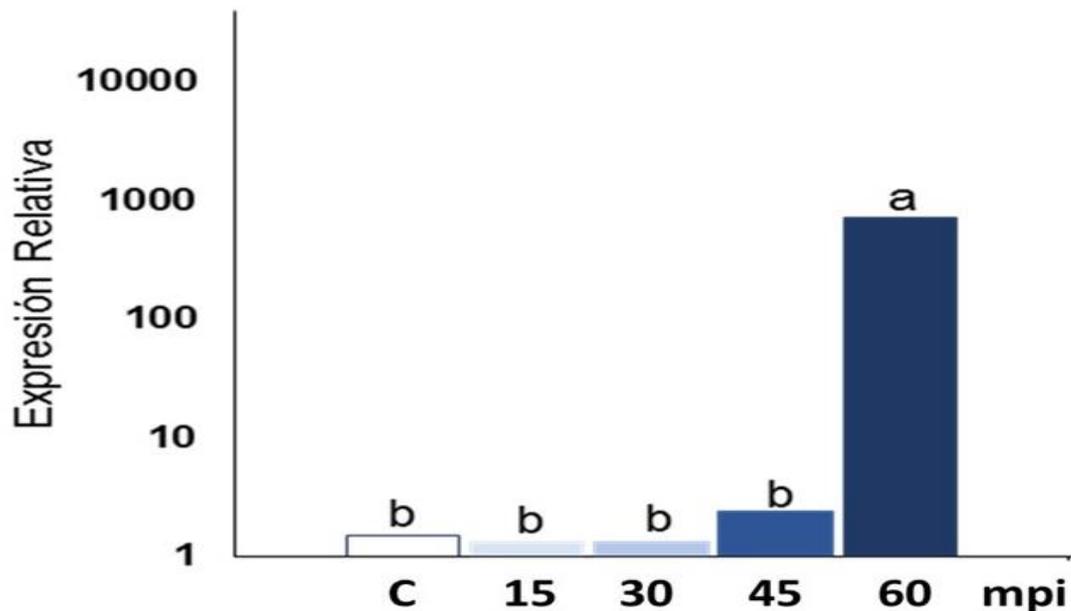


Figura 13. Niveles de expresión relativa del gen Aleno Oxido Ciclasa (*aoc*) en respuesta del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Manzano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n= 3$). $ET_{MZ}= 3.68$

La expresión relativa a los 60 mpi en el cultivar susceptible pudiera explicarse debido a que el gen de la AOC se activó luego de la transcripción de los genes *myc2* y puede ser débilmente reprimido por la expresión del gen *NPR1*. Se observó un retardo en la expresión del gen *aoc* en este cultivar.

En la figura 14 se observó que en el cultivar Gran Enano se detectaron niveles de expresión relativa del gen *aoc* de 10000 veces y en más de 1000 veces superiores a los 15 y 30 mpi con el FC respectivamente comparado con el calibrador.

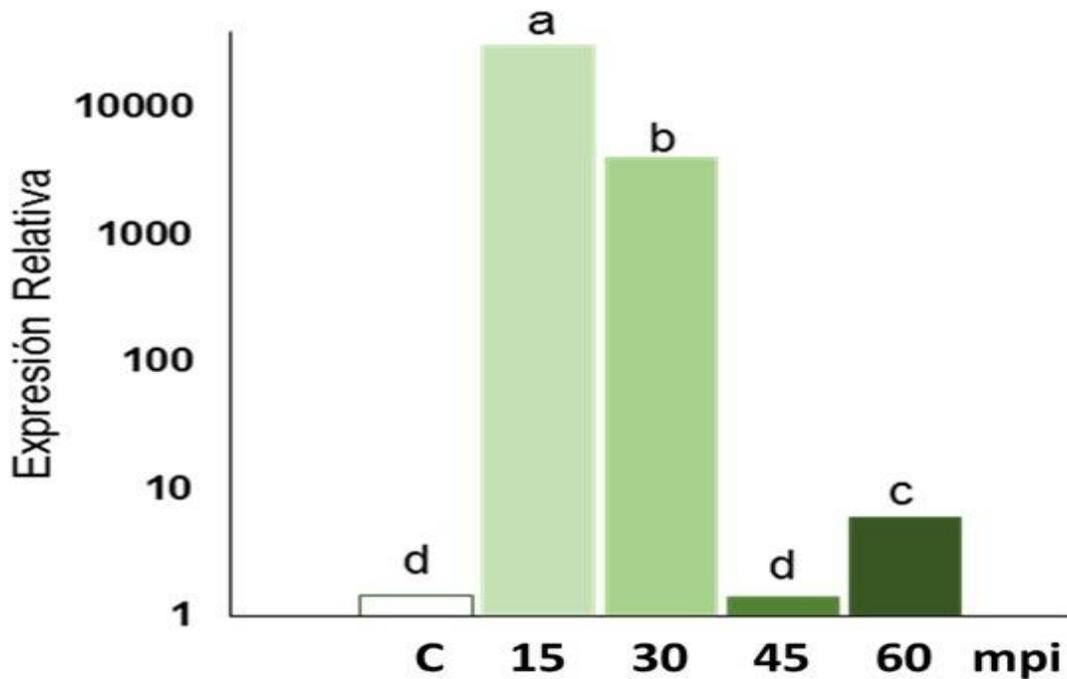


Figura 14. Niveles de expresión relativa del gen Aleno Oxido Ciclasa (*aoc*) en respuesta del FC de *F. oxysporum* f. sp. *cupense* raza 1. El rango de expresión se determinó por RT-PCR cuantitativo en relación a un “calibrador”, los niveles de expresión del transcrito en hojas de Gran Enano sin tratar con el filtrado (inductor) y en cada momento evaluado (mpi, minutos post inducción del FC de Foc). Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por ANOVA y test de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$, $n=3$). $ET_{GE}=3.27$

Durante los 45 mpi los valores de expresión relativa del gen *aoc* disminuyeron de forma considerable, no se observó diferencias significativas comparado con el calibrador. A los 60 mpi se apreciaron niveles incrementados de 10 veces en comparación con el calibrador.

La AOC es una enzima esencial en la ruta biosintética del ácido jasmónico (JA) en plantas. La respuesta del cultivar susceptible Manzano a los elicitores presentes en el filtrado de cultivo se observó con un notable efecto retardado. Sin embargo, en el cultivar resistente Gran Enano se activaron los genes 15 minutos posteriores a la inoculación del filtrado de cultivo.

Se sabe que tras la percepción de un elicitador el JA es sintetizado de novo. Luego de la activación de las fosfolipasas de la membrana del cloroplasto liberan ácido linolénico a partir de los galactolípidos. Este lípido es el sustrato principal de la ruta de síntesis del JA. El ácido linolénico libre es oxigenado por las enzimas lipoxigenasas (LOX, EC.13.11.-) y luego convertido a ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) a través de la acción combinada de la aleno oxido sintetasa (AOS, EC 4.2.1.92) y la aleno oxido ciclasa (AOC, EC 5.3.99.6). El ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA) es posteriormente transformado a JA por reducción y tres ciclos de β -oxidación (Durand, *et al.*, 2016).

A manera de resumen de esta parte podemos decir que los resultados obtenidos confirman que tanto la ruta del SA como la del JA se activaron ante el tratamiento con elicitores de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Los genes marcadores de estas rutas incrementaron su expresión en el cultivar resistente en relación con plantas no tratadas y con el cultivar susceptible. Como las rutas del ácido salicílico y el ácido jasmónico son antagónicas, los genes que se sobre-expresaron fueron los genes marcadores de ácido jasmónico (*myc2* y *aoc*), sin embargo, los genes conducentes a la ruta del SA fueron inducidos en el cultivar resistente Gran Enano. Los niveles de expresión de estos genes no fueron suficientes para bloquear la expresión del factor de transcripción *myc2*, que a los 15 mpi indujo la transcripción de los genes de respuesta temprana a JA como el gen de *aoc*. Ello sienta las bases para el uso de compuestos comerciales que tienen como compuesto activo el SA o el JA para combatir la enfermedad.

4.2 Evaluación del efecto de Actigard y el Biojas en la inducción de la resistencia del cultivar Manzano frente al filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1

Las rutas del SA como la del JA se activaron con la aplicación del FC de Foc. Resulta de interés determinar el efecto de compuestos que activen las defensas de las plantas frente a patógenos. El área de la lesión en hojas de Manzano asperjadas con las concentraciones de Actigard (6; 12 y 18 g L⁻¹) e inoculadas mediante el Bioensayo de punteadura con el filtrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1, se muestran en la figura 15.

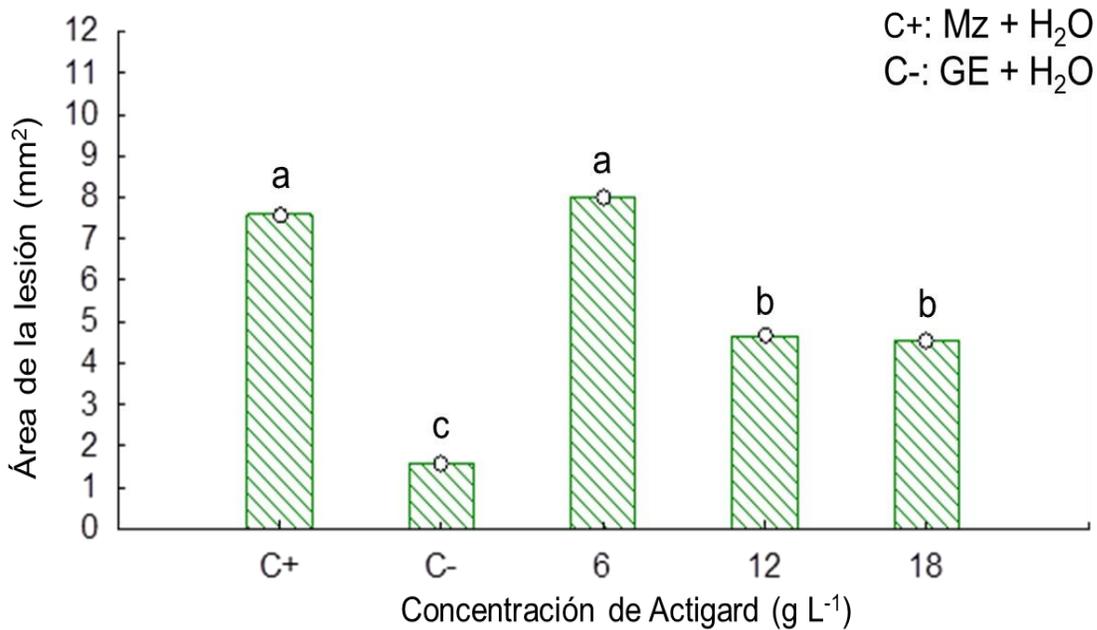


Figura 15. Área de la lesión en hojas de Manzano asperjadas con las concentraciones de Actigard (6; 12 y 18 g L⁻¹) e inoculadas mediante el Bioensayo de punteadura con el filtrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* raza 1 colectado a los 15 días. Barras con letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Análisis por One-Way ANOVA y test de Tukey ($p \leq 0.05$, $n=48$)

Con la aplicación de 6 g L⁻¹ de Actigard no se logran proteger las plantas del cultivar Manzano frente al FC del patógeno. Los valores del área de la lesión (7,83 mm²) son similares a los alcanzados en las plantas susceptibles inoculadas con agua (control positivo). Sin embargo, al comparar la reducción del área de la lesión en las concentraciones 12 y 18 g L⁻¹, respectivamente, se observó una reducción significativa en el área para estas concentraciones, sin existir diferencias significativas entre ellas. Una disminución del área de la lesión en plantas susceptibles asperjadas con los inductores, implica la protección frente al FC de Foc1.

Se seleccionó la concentración de 12 g L⁻¹ de Actigard como una alternativa a utilizar para inducir resistencia en los cultivos susceptibles. Respaldada por la expresión de los genes vinculados a la ruta del ácido salicílico en la respuesta de las plantas frente a Foc. La máxima concentración (18 g L⁻¹) no logró una mayor reducción del área de la lesión, lo que puede deberse a la no absorción del producto por la planta. La tendencia en la actualidad, es a economizar gastos y si con la concentración mínima se obtienen los mismos resultados que con una concentración mayor lo lógico sería aplicar la menor cantidad de producto inductor.

El AS es altamente móvil dentro de la planta, puede proteger partes no cubiertas en la aplicación foliar. Se puede aplicar por el sistema de riego para ser absorbido por el sistema radicular. Sin embargo, las aplicaciones de AS no significan una absorción o inducción inmediata de la resistencia. Según algunos estudios las plantas demoran de 4 a 7 días para levantar sus defensas. Además, es un compuesto preventivo que controla varios hongos, bacterias y virus pero también tiene actividad insecticida (Devadas, *et al.*, 2002; Di, *et al.*, 2016).

Diferentes grupos de investigadores han demostrado que el producto Bion 50 SC o Actigard cuyo ingrediente activo es el acibenzolar-S-metil induce resistencia sistémica en numerosos

hospederos frente a un amplio rango de patógenos. Como ejemplos pueden citarse las interacciones siguientes: melón – virus del mosaico del pepino (Smith-Becker *et al.*, 2003), plátano - *Mycosphaerella fijensis* (Márquez, *et al.*, 2007), arroz - *Stenotarsonemus spinki* (Peteira *et al.*, 2008), melón - *Pseudoperonospora cubensis* (Méndez, *et al.*, 2010) y manzana - *Erwinia amylovora* (Shahini *et al.*, 2010).

El área de la lesión en hojas de Manzano asperjadas con Biojas, se muestran en la figura 16. No se observaron diferencias significativas en las tres concentraciones de Biojas evaluadas (0,5; 1,0 y 1,5 ml L⁻¹).

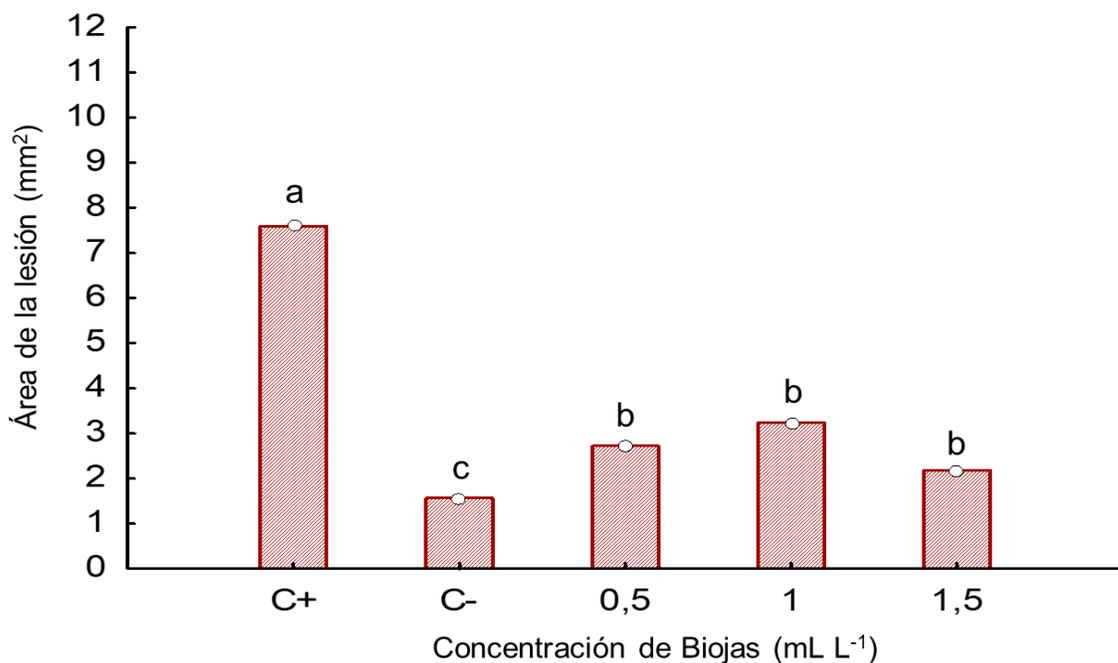


Figura 16. Área de la lesión en hojas de Manzano asperjadas con tres dosis de Biojas (0,5; 1,0; 1,5 ml) e inoculadas con el filtrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 cosechado a los 15 días mediante el Bioensayo de punteadura. Medias con letras distintas difieren significativamente (One-Way ANOVA y Tukey para $p \leq 0.05$, $n=48$)

Los valores en el área de la lesión se encontraron por debajo de los 4 mm² en todos los casos. Resultaron inferiores a las alcanzadas con Actigard. Sin embargo, el cultivar

resistente, Gran Enano, presenta menores afectaciones medida como área de la lesión. Por lo que, el Biojas logra una mayor protección de las plantas frente al FC de Foc. Se minimizó el daño ocasionado por el ácido fusárico, toxina presente en los filtrados del cultivo del hongo (Portal, *et al.*, 2017).

Se seleccionó la concentración 0,5 ml L⁻¹ de Biojas para realizar el tratamiento combinado. Es la menor concentración con la que se logró una protección efectiva de las plantas susceptibles. El grupo de los jasmonatos actúan como moléculas señalizadoras de respuestas en plantas a numerosas situaciones de estrés y son promotores de defensa en plantas (Anderson, *et al.*, 2004). El ácido jasmónico demostró acciones de defensa en varias especies ante patógenos (Berrocal-Lobo, *et al.*, 2002).

Por otra parte, El-Khallal (2007) aplicaron en plantas de tomate elicitores (ácido jasmónico y ácido salicílico) para inducir resistencia contra *Fusarium*. Se detectaron cambios en las enzimas de antioxidante, compuestos fenólicos y proteínas. La estrategia de combinación entre ambos elicitores (sinérgica o antagónicamente) jugaron papeles importantes al aumentar los sistemas de defensa y alterar la expresión de genes de defensa como las PR-proteínas lo que permitió que aumentara la resistencia en la planta de tomate contra la marchitez.

La combinación de los compuestos evaluados en el presente trabajo indica que existe un antagonismo en las rutas metabólicas del ácido salicílico y el ácido jasmónico (Figura 17). No existieron diferencias significativas en el área de la lesión de la combinación de ambos productos, Actigard y Biojas, con respecto al área de la lesión observada con la concentración de ácido salicílico (12 g L⁻¹).

Según Li, *et al.* (2012), la señalización de SA no mostró diferencias significativas entre el clon susceptible y un mutante resistente a Foc4; mientras que los niveles de expresión de uno genes semejantes a aleno oxido sintetasa (*aos*) indicaron que los niveles endógenos

de JA en el mutante resistente eran mucho más altos que en las plantas de tipo silvestre. Esto sugiere que la resistencia al patógeno necrotrófico Foc4 estuvo mediada por las rutas de señalización de JA y no por la del SA.

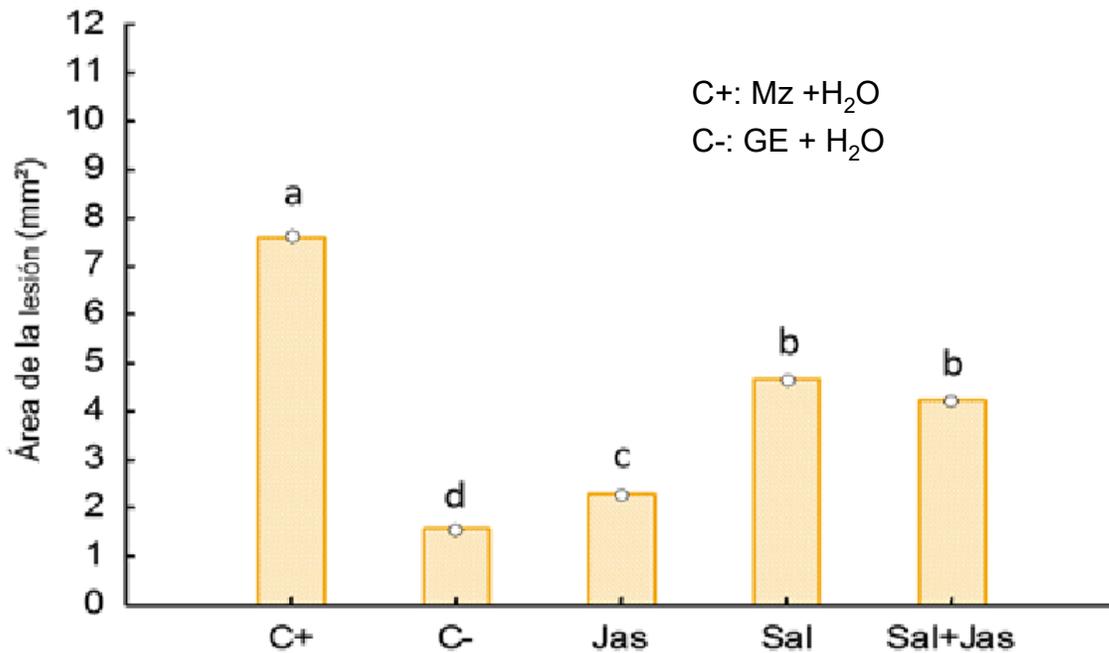


Figura 17. Área de la lesión de hojas de Manzano asperjadas con dosis media de Actigard y Biojas (12 g y 1,0 ml respectivamente) y una dosis combinada de 12 g de Actigard y 1,0 ml de Biojas e inoculadas con el filtrado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* R₁ cosechado a los 15 días mediante el Bioensayo de punteadura. Medias con letras distintas difieren significativamente (One-Way ANOVA y Tukey para $p \leq 0.05$, $n=48$).

La idea de acelerar la respuesta de la planta mediante la aplicación de inductores de resistencia sistémica se considera y supondría, al mismo tiempo, una alternativa biológica, ambiental y comercialmente viable, a los métodos actuales de control de patógenos mediante el uso tradicional de pesticidas químicos.

La divergencia de los resultados implicados en la respuesta de las plantas puede estar relacionado con el carácter hemibiotrófico de Foc, con una fase necrotrófica extensa

(Ploetz, 2015); lo que sugiere que en la “batalla natural” participan señales diferentes para cada estilo de vida. La interacción de la planta con el patógeno y su respuesta defensiva es compleja por lo que se considera que inocular el patógeno directamente en la planta permitirá dar una mejor explicación de los procesos que se desencadenan.

5. CONCLUSIONES

1. Con la aplicación del filtrado de cultivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* se activaron los genes de las rutas del ácido salicílico y el ácido jasmónico. El factor de transcripción *myc2* y el gen *aoc*, de la ruta del ácido jasmónico, alcanzaron mayores niveles de activación en el cultivar resistente.
2. La aplicación de Actigard y Biojas protegen las plantas de banano frente a la fusariosis. El Biojas indujo mayor resistencia en el cultivar Manzano con la disminución del área de la lesión. La combinación de ambos compuestos disminuye el efecto protector del Biojas frente a la fusariosis.

6. RECOMENDACIONES

- Determinar dosis y frecuencia de aplicación del Actigard y Biojas con el patógeno *in vivo*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Agrios, G. 2005. Plant diseases caused by fungi. *Plant Pathology*. 4 57-77.
- Anderson, J. P.; Badruzaufari, E.; Schenk, P. M.; M., M. J.; Desmond, O. J.; C., E.; Maclean, D. J.; Ebert, P. R.; Kazan, K. 2004. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 16: (7): 3460-3479.
- Bai, T.-T.; Xie, W.-B.; Zhou, P.-P.; Wu, Z.-L.; Xiao, W.-C.; Zhou, L.; Sun, J.; Ruan, X.-L.; Li, H.-P. 2013. Transcriptome and expression profile analysis of highly resistant and susceptible banana roots challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Plos one*. 8 (9): e73945.
- Batlle, A.; Pérez, L. 2009. Variabilidad genética de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en bananos y plátanos de Cuba. *Fitosanidad*. 13 (3): 169-186.
- Berrocal-Lobo, M.; Molina, A. 2004. Ethylene response factor 1 mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microb. Interact.* 17 763-770.
- Berrocal-Lobo, M.; Molina, A.; Solano, R. 2002. Constitutive expression of ethylene-response-factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J*. 29 (5): 23-32.
- Bittel, P.; Robatzek, S. 2007. Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current opinion in plant biology*. 10 (4): 335-341.
- Borges, A.; Borges-Pérez, A.; Fernandez-Falcon, M. 2004. Induced resistance to Fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. *Crop Protection*. 23 (12): 1245-1247.
- Campbell, P.; Latorre, B. 2004. Suppression of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*) by acibenzolar-S-methyl. *Vitis*. 43 (4): 209-210.
- Carvalho, A.; Gomes, M. 2009. Plant defensins—prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*. 30 (5): 1007-1020.
- Collinge, D. B.; Gregersen, L.; Thordal-Christensen, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. En: Dekker M. (ed.) *Mechanisms of Plant Growth and Improved Productivity: Modern Approaches and Perspectives*. New York: AS Basra. pp. 391-433.
- Companiononi, B.; Arzola, M.; Rodríguez, Y.; Mosqueda, M.; Pérez, M. C.; Borrás, O.; Lorenzo, J. C.; Santos, R. 2003. Use of culture-derived *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, race 1 filtrates for rapid and non-destructive in vitro differentiation between resistant and susceptible clones of field-grown banana. *Euphytica*. 130 (3): 341-347.
- Chellappan, N. V.; Fokkens, L.; Houterman, P. M.; Rep, M.; Cornelissen, B. J. 2016. Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2548-16.
- D'Hont, A.; Denoeud, F.; Aury, J.-M.; Baurens, F.-C.; Carreel, F.; Garsmeur, O.; Noel, B.; Bocs, S.; Droc, G.; Rouard, M. 2012. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*. 488 (7410): 213-217.

- Davey, M. W.; Gudimella, R.; Harikrishna, J. A.; Sin, L. W.; Khalid, N.; Keulemans, J. 2013. A draft *Musa balbisiana* genome sequence for molecular genetics in polyploid, inter- and intra-specific *Musa* hybrids. *BMC genomics*. 14 (1): 683.
- Davis, R. 2005. Fusarium wilt (Panama disease) of banana. Pest Advisory Leaflet No 42. Secretariat of the Pacific Community. Oceania.
- De Langhe, E.; Hribov, E.; Carpentier, S.; Dolezel, J.; Swennen, R. 2010. Did backcrossing contribute to the origin of hybrid edible bananas? *Ann Bot*. 106 (6): 849-857.
- de Sain, M.; Rep, M. 2015. The Role of Pathogen-Secreted Proteins in Fungal Vascular Wilt Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 16 23970-23993.
- De Wit, P. J. 1997. Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in plant science*. 2 452-458.
- De Wit, P. J. 2016. *Cladosporium fulvum* effectors: weapons in the arms race with tomato. *Annual review of phytopathology*. 54 1-23.
- Dean, R.; Van Kan, J. A.; Pretorius, Z. A.; Hammond-Kosack, K. E.; Di Pietro, A.; Spanu, P. D.; Rudd, J. J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*. 13 (4): 414-430.
- Derksen, H.; Rampitsch, C.; Daayf, F. 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant science*. 207 79-87.
- Devadas, S. K.; Enyedi, A.; Raina, R. 2002. The *Arabidopsis* *hrl1* mutation reveals novel overlapping roles for salicylic acid, jasmonic acid ethylene signalling in cell death and defence against pathogens. *The Plant Journal*. 30 467-480.
- Di, X.; Takken, F. L.; Tintor, N. 2016. How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in plant science*. 7 170.
- Dita, M. A.; Waalwijk, C.; Buddenhagen, I. W.; Souza, M. T.; Kema, G. H. J. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology*. 59 (2): 348-357.
- Dong, S.; Stam, R.; Cano, L. M.; Song, J.; Sklenar, J.; Yoshida, K.; Bozkurt, T. O.; Oliva, R.; Liu, Z.; Tian, M. 2014. Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen. *Science*. 343 (6170): 552-555.
- Dong, X.; Ling, N.; Wang, M.; Shen, Q.; Guo, S. 2012. Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiol Biochem*. 21 (171-179).
- Drenth, A.; Guest, D. I. 2016. Fungal and oomycete diseases of tropical tree fruit crops. *Annual review of phytopathology*. 54 373-395.
- Dubiella, U.; Seybolda, H.; Duriana, G.; Komandera, E.; Lassiga, R.; Wittea, C.; Schulzeb, W. X.; Romeisa, T. 2013. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation *PNAS* 110 (21): 8744-8749
- Durand, A. N.; Pauwels, L.; Goossens, A. 2016. The ubiquitin system and jasmonate signaling plants. 5 (6): 11-22.
- El-Khallal, S. M. 2007. Induction and modulation of resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt disease by bioagent fungi (arbuscular mycorrhiza) and/or hormonal elicitors (jasmonic acid & salicylic acid): 2-changes in the antioxidant enzymes, phenolic compounds and pathogen related-proteins. *Aust J Basic Appl Sci*. 1 (4): 717-732.

- Erima, R.; Ssebuliba, J.; Nankinga, C.; Ragama, P.; Barekye, A.; Tushemereirwe, W. 2016. Yield performance of East African highland banana hybrids on farmers fields under high disease pressure. *African Journal of Agricultural Research*. 11 (13): 1141-1149.
- FAO. 2017. Banana - world exports. [on-line], [visitado en: 19 de febrero de 2018] Disponible en <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/en/>; <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/en/>
- Fernández-Falcón, M.; Alvarez, C.; Gorrín, R.; Hernández, M.; Borges, A. 2009. Influence of a menadione derivative on banana panama disease development and yield enhancement. *Open Horticult. J.* 2 49-53.
- Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of phytopathology*. 9 275-296.
- Fortunato, A. A.; Rodrigues, F. Á.; Baroni, J. C. P.; Soares, G. C. B.; Rodriguez, M. A. D.; Pereira, O. L. 2012. Silicon suppresses Fusarium wilt development in banana plants. *Journal of Phytopathology*. 160 (11-12): 674-679.
- Fourie, G.; Steenkamp, E. T.; Ploetz, R. C.; Gordon, T.; Viljoen, A. 2011. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*. 11 (3): 533-542.
- Fu, L.; Penton, C. R.; Ruan, Y.; Shen, Z.; Xue, C.; Li, R.; Shen, Q. 2017. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana Fusarium wilt disease. *Soil Biology and Biochemistry*. 104 39-48.
- Gabriel, D. 1999. Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55 205-214
- Gang, G.; Bizun, W.; Weihong, M.; Xiaofen, L.; Xiaolin, Y.; Chaohua, Z.; Jianhong, M.; Huicai, Z. 2013. Biocontrol of Fusarium wilt of banana: Key influence factors and strategies *African Journal of Microbiology Research*. 7 (41): 4835-4843.
- García-Bastidas, F.; Ordóñez, N.; Konkol, J.; Al-Qasim, M.; Naser, Z.; Abdelwali, M.; Salem, N.; Waalwijk, C.; Ploetz, R.; Kema, G. 2014. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 associated with Panama disease of banana outside Southeast Asia. *Plant disease*. 98 (5): 694-694.
- Gilardi, G.; Franco, S.; van Rijswijk, P. C. J.; Ortu, G.; Gullino, M. L.; Garibaldi, A. 2016. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* of lettuce. *Plant Pathology* 677-688.
- Gimenez-Ibanez, S.; Chini, A.; Solano, R. 2016. How Microbes Twist Jasmonate Signaling around Their Little Fingers. *Plants*. 5 9.
- Glazebrook, J. 2005. Constrating mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*. 43 205-227.
- Groenewald, S.; Van Den Berg, N.; Marasas, W.; Viljoen, A. 2006. The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Mycological research*. 110 (3): 297-305.
- Guo, L.; Han, L.; Yang, L.; Zeng, H.; Fan, D.; Zhu, Y.; Feng, Y.; Wang, G.; Peng, C.; Jiang, X. 2014. Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. *Plos one*. 9 (4): e95543.

- Hanaa, R. F.; Abdou, Z. A.; Salama, D. A.; Ibrahim, M. A.; Srour, H. 2011. Effect of neem and willow aqueous extracts on Fusarium wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Sciences*. 56 (1): 1-7.
- Heath, M. C. 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*. 44 321-334.
- Hein, I.; Gilroy, E. M.; Armstrong, M. R.; Birch, P. R. 2009. The zig-zag-zig in oomycete–plant interactions. *Molecular plant pathology*. 10 (4): 547-562.
- Hubert, O.; Fils-Lycaon, B.; Chillet, M.; Baurens, F. C. 2008. EIN3-like gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Grande naine). *Physiologia Plantarum*. 133 (2): 435-448.
- Hutcheson, S. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Annual review of phytopathology*. 36 59-90.
- Hwang, S.; Ko, W. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to Fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant disease*. 88 (6): 580-588.
- INIVIT. 2007. Instructivo Técnico del Cultivo del Plátano. Ministerio de la Agricultura. Instituto de Investigaciones de Viadas Tropicales. 1 (1): 2.
- Janssens, S. B.; Vandeloock, F.; de Langhe, E.; Verstraete, B.; Smets, E.; van den Houwe, I.; Swennen, R. 2016. Evolutionary dynamics and biogeography of *Musaceae* reveal a correlation between the diversification of the banana family and the geological and climatic history of Southeast Asia. *New Phytologist*. 210 (4): 1453- 1465.
- Jones, J. D.; Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444 323-329.
- Kim, D. S.; Hwang, B. K. 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonialyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens. *Journal of experimental botany*. 65 (9): 2295-2306
- Kim, Y. C.; Blee, K. A.; Robins, J.; Anderson, A. J. 2001. Oxycom™ under field and laboratory conditions increases resistance responses in plants. *European Journal of Plant Pathology*. 107 (1): 129-136.
- Kuai, X.; MacLeod, B. J.; Després, C. 2015 Integrating data on the Arabidopsis NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. *Front. Plant Sci*. 6 235.
- Kubiriba, J.; Ssali, R. T.; Barekye, A.; Akankwasa, K.; Tushemereirwe, W. K.; Batte, M.; Karamura, E. B.; Karamura, D. 2016. The performance of East African highland bananas released in farmers' fields and the need for their further improvement. *Acta Horti*. 1114 231-238.
- Li, C.-y.; Deng, G.-m.; Yang, J.; Viljoen, A.; Jin, Y.; Kuang, R.-b.; Zuo, C.-w.; Lv, Z.-c.; Yang, Q.-s.; Sheng, O. 2012. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4. *BMC genomics*. 13 (1): 374.
- Li, C.; Shao, J.; Wang, Y.; Li, W.; Guo, D.; Yan, B.; Xia, Y.; Peng, M. 2013a. Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *BMC genomics*. 14 (1): 851.

- Li, C.; Zuo, C.; Deng, G.; Kuang, R.; Yang, Q.; Hu, C.; Sheng, O.; Zhang, S.; Ma, L.; Wei, Y. 2013b. Contamination of bananas with beauvericin and fusaric acid produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Plos one. 8 (7): e70226.
- Li, G.; Huang, S.; Guo, X.; Li, Y.; Yang, Y.; Guo, Z.; Kuang, H.; Rietman, H.; Bergervoet, M.; Vleeshouwers, V. G. 2011. Cloning and characterization of R3b; members of the R3 superfamily of late blight resistance genes show sequence and functional divergence. Molecular plant-microbe interactions. 24 (10): 1132-1142.
- Li, W. M.; Dita, M.; Wu, W.; Hu, G. B.; Xie, J. H.; Ge, X. J. 2014. Resistance sources to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in banana wild relatives. Plant Pathology. 64 1061-1067.
- Li, X.; Bai, T.; Li, Y.; Ruan, X.; Li, H. 2013c. Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4-inoculated response to Fusarium wilts in the banana root cells. Proteome Sci. 11 (2): 1-14.
- Lin, W. C.; Lu, C. F.; Wu, J. W.; Cheng, M. L.; Lin, Y. M.; Yang, N. S. 2004. Transgenic tomato plants expressing the Arabidopsis NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. Transgenic Res. 13 567-581.
- Lu, Y.; Liao, D.; Pu, J.; Qi, Y.; Xie, Y. 2013. Proteome analysis of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Plant Pathology. 84 163–171.
- Ma, L. J.; Geiser, D. M.; Proctor, R. H.; Rooney, A. P.; O'Donnell, K.; Trail, F.; Gardiner, D. M.; Manners, J. M.; Kazan, K. 2013. *Fusarium* pathogenomics. . Annu. Rev. Microbiol. 67 399-416.
- Makandar, R.; Nalam, V.; Chaturvedi, R.; Jeannotte, R.; Sparks, A. A.; Shah, J. 2010. Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis interaction with *Fusarium graminearum*. Molecular plant-microbe interactions. 23 (7): 861-870.
- Mandadi, K. K.; Scholthof, K. B. G. 2013. Plant Immune Responses against viruses: How does a virus cause disease? The Plant Cell. 25 1489-1505.
- Marinho, H. S.; Real, C.; Cyrne, L.; Soares, H.; Antunes, F. 2014. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. Redox biology. 2 (3): 535-562.
- Márquez, L.; Castaño, J. 2007. Inducción de resistencia a sigatocas en plántulas de plátano Dominico-Hartón. Agronomía. 15 (2): 49-57.
- Mejía, D. M.; Rodas, E. I.; Patiño, L. F.; González, E. P. 2009. Efecto del acibenzolar-s-metil sobre el desarrollo de la virosis causada por *potyvirus* en tomate de árbol. Agronomía Colombiana. 27 (1): 87.
- Méndez, W.; Arauz, L. F.; Ríos, R. 2010. Evaluación de fungicidas convencionales e inductores de resistencia para el combate de mildiú vellosa (*Pseudoperonospora cubensis*) en melón. Agronomía Costarricense. 34 (2): 153-164.
- Miedes, E.; Vanholme, R.; Boerjan, W.; Molina, A. 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. Frontiers in plant science. 5 (2): 358.
- Mohapatra, D.; Mishra, S.; Sutar, N. 2010. Banana post harvest practices: Current status and future prospects-a review. Agricultural Reviews. 31 (1): 56-62.
- Moore, N.; Pegg, K.; Bentley, S.; Jones, D. 1995. Fusarium wilt of banana. Musa Disease Fact Sheet (INIBAP).

- Nishizawa, Y.; Nishio, Z.; Nakazono, K.; Soma, M.; Nakajima, E.; Ugaki, M.; Hibi, T. 1999. Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theoretical and Applied Genetics*. 99 383-390.
- Nürnberger, T.; Brunner, F. 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current opinion in plant biology*. 5 (4): 318-324.
- Ocimati, W.; Karamura, D.; Rutikanga, A.; Sivirihauma, C.; Ndungo, V.; Ntamwira, J.; Kamira, M.; Kanyaruguru, J.; Blomme, G. 2013. 22 Agronomic Practices for *Musa* across Different Agro-ecological Zones in Burundi, Eastern Democratic Republic of Congo and Rwanda. *Banana Systems in the Humid Highlands of Sub-Saharan Africa* 175.
- Oliveira, M. D. M.; Varanda, C. M. R.; M.R.F., F. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters*. 15 152-158.
- Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B.; Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*. 107 (1): 19-28.
- Ortiz, R.; Swennen, R. 2014. From crossbreeding to biotechnology-facilitated improvement of banana and plantain. *Biotechnology Adv.* 32 (1): 158–169.
- Pan, Q.; Wendel, J.; Fluhr, R. 2000. Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene Homologues in Dicot and Cereal Genomes. *Journal of Molecular Evolution*. 50 203-213.
- Paparu, P.; Dubois, T.; Coyne, D.; Viljoen, A. 2007. Defense-related gene expression in susceptible and tolerant bananas (*Musa* spp.) following inoculation with non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes and challenge with *Radopholus similis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 71 (4-6): 149-157.
- Parkunan, V.; Johnson, C.; Eisenback, J. 2011. Influence of acibenzolar-s-methyl and mixture of bacillus species on growth and vigor of cultivated tobacco. *Tobacco Science*. 5 (3): 7-14.
- Pegg, G. F.; Young, D. H. 1982. Purification and characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium albo-atrum*-infected tomato plants, and from *V. albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology*. 3 (21): 389-398.
- Pérez, C. 2005. Técnicas estadísticas con SPSS 12. Aplicación al análisis de datos. Pearson Educación S. A., España. 4 (1): 10-85.
- Pérez, L.; Batlle, A.; Fonseca, J. (2009) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en Cuba: biología de las poblaciones, reacciones de los clones híbridos de la FHIA y biocontrol. *Proceedings of the Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos*, Guayaquil, Ecuador, pp. 141-155.
- Ploetz, R.; Freeman, S.; Konkol, J.; Al-Abed, A.; Naser, Z.; Shalan, K.; Barakat, R.; Israeli, Y. 2015a. Tropical race 4 of Panama disease in the Middle East. *Phytoparasitica*. 43 (3): 283-293.
- Ploetz, R. C. 2006. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*. 96 653-656.

- Ploetz, R. C. 2015. Management of Fusarium wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. *Crop Protection*. 73 (2): 7-15.
- Ploetz, R. C.; Kema, G. H.; Ma, L. J. 2015b. Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annu Rev Phytopathol*. 53 269-288.
- Portal, N.; Soler, A.; Alphonsine, P. A. M.; Borrás-Hidalgo, O.; Portieles, R.; Peña-Rodríguez, L. M.; Yanes, E.; Herrera, L.; Solano, C.; Ribadeneira, J.; Walton, J. D.; Santos, R. 2017. Nonspecific toxins as components of a host-specific culture filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Plant Pathology*. 2 (3): 1-10.
- Raman, T.; Varun, G.; Perumal, G. D. 2016. Identification of differentially expressed genes from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Trichoderma asperellum* (pr2) interaction in the susceptible banana cultivar Grand Naine. *Turk J Bot*. 40 480-487.
- Reymond, P.; Farmer, E. E. 1998. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Plant Biology*. 1 (5): 404-411.
- Rodríguez-Nodals, A. 1991. Avances en el programa de mejoramiento genético del banano y el plátano en el INIVIT en Cuba: un avance de investigación. *Informusa*. 1 (1): 25-34.
- Ryals, J. A.; Neuenschwander, U. H.; Willits, M. G.; Molina, A.; Steiner, H. Y.; Hunt, M. D. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*. 8 1009-1819.
- Santén, K.; Marttila, S.; Lijjeroth, E.; Bryngelsson, T. 2005. Immunocytochemical localization of the pathogenesis-related PR-1 protein in barley leaves after infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66 (2): 45-54.
- Sarris, F.; Cevik, V.; Dagdas, G.; Jones, D. G.; Krasileva, V. 2016. Comparative analysis of plant immune receptor architectures uncovers host proteins likely targeted by pathogens. *BMC biology*. 14 (1): 8.
- Shah, J.; Tsui, F.; Klessig, D. F. 1997. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Molecular Plant-Microbe Interact*. 10 69-78
- Shetty, S. M.; Shah, M.; Ulfa, M.; Makale, K.; Mohd-Yusuf, Y.; Khalid, N.; Othman, R. Y. 2016. Complete chloroplast genome sequence of *Musa balbisiana* corroborates structural heterogeneity of inverted repeats in wild progenitors of cultivated bananas and plantains. *The plant genome*. 9 (2): 1-14.
- Siddhesh, B.; Shekhawat, U. K.; Ganapathi, T. R. 2014. Host-induced post-transcriptional hairpin RNA-mediated gene silencing of vital fungal genes confers efficient resistance against Fusarium wilt in banana. *Plant biotechnology journal*. 12 (5): 541-553.
- Sierotzki, H.; Scalliet, G. 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*. 103 (9): 880-887.
- Simmonds, N. W. 1962. *The Evolution of the Bananas*. The Evolution of the Bananas.
- Stover, R.; Malo, S. 1972. The occurrence of Fusarial wilt in normally resistant Dwarf Cavendish banana. *Plant Disease Reporter*.
- Stover, R.; Simmonds, N.; Bananas, L. S. 1987. *Bananas*. Longman scientific and Technical. New York, USA468.

- Stover, R. H. 1962. Studies of Fusarium wilt of Bananas. VIII Differentiation of clones by cultural interaction and volatile substances. *Journal of Bot.* 40 1467-1471.
- Swarupa, V.; Ravishankar, K.; Rekha, A. 2014. Plant defense response against Fusarium oxysporum and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta.* 239 (4): 735-751.
- Takken, F.; Joosten, M. 2000. Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *European Journal of Plant Pathology.* 106 699-713.
- Tang, X.; Frederik, R.; Zhou, J.; Harlerman, D.; Jia, Y.; Martin, G. 1996. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of avrPto and Pto kinase. *Science.* 274 2060-2063.
- Thakker, J. N.; Patel, S.; Dhandhukia, P. C. 2013. Induction of defense-related enzymes in banana plants: Effect of live and dead pathogenic strain of Fusarium oxysporum f. sp. cubense. *ISRN biotechnology.* 2013.
- Thapa, S. P.; Coaker, G. 2016. Genome sequences of two *Pseudomonas syringae* pv. tomato race 1 strains, isolated from tomato fields in California. *Genome announcements.* 4 (2): e01671-15.
- Thevissen, K.; Warnecke, D. C.; François, I. E.; Leipelt, M.; Heinz, E.; Ott, C.; Zähringer, U.; Thomma, B. P.; Ferket, K. K.; Cammue, B. P. 2004. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry.* 279 (6): 3900-3905.
- Thomma, B. P.; Nelissen, I.; Eggermont, K.; Broekaert, W. F. 1999. Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal.* 19 (2): 163-171.
- Thompson, A. K. 1995. *Banana processing Bananas and plantains*: Springer. pp. 481-492.
- Usharani, T.; Sowmya, H.; Sunisha, C.; Mohandas, S. 2016. *Engineering Resistance to Fusarium Wilt Banana: Genomics and Transgenic Approaches for Genetic Improvement*: Springer. pp. 211-226.
- van der Berg, N.; Berger, D. K.; Hein, I.; Birch, P. R. J.; Wingfield, M. J.; Viljoen, A. 2007. Tolerance in banana to Fusarium wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Molecular plant pathology.* 8 (3): 333-341.
- Van Loon, L. C.; Rep, M.; Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants *Annual Review Phytopathology.* 44 135-162.
- Venkatesh, A.; Krishna, V.; Kumar, K. G.; Pradeepa, K.; Santosh Kumar, S. R.; Kumar, R. S. 2013. Biochemical markers assisted screening of Fusarium wilt resistant *Musa paradisiaca* (L.) cv. puttabale micropropagated clones. *Indian J. Exp. Biol.* 51 531-542.
- Verma, V.; Ravindran, P.; Kumar, P. P. 2016. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*(16): 86.
- Vidhyasekaran, P. 2008. *Fungal pathogenesis in plants and crops.* . CRC Press.
- Wang, Z.; Zhang, J. B.; J, H. C.; Liu, J. H.; Li, Y. Q.; Yin, X. M.; Xu, B. Y.; Jin, Z. Q. 2012. De Novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 infection. *BMC genomics*(13): 650.

- Wasternack, C.; Hause, B. 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of botany*. 111 (6): 1021-1058.
- Withers, J.; Dong, X. 2016. Posttranslational modifications of NPR1: A single protein playing multiple roles in plant immunity and physiology. *PLoS Pathog*. 12 (8): e1005707.
- Wu, Y.; Yi, G.; Peng, X.; Huang, B.; Liu, E.; Zhang, J. 2013. Systemic acquired resistance in Cavendish banana induced by infection with an incompatible strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Journal of plant physiology*. 170 (11): 1039-1046.
- Xiao, R. F.; Zhu, Y.-J.; Li, Y.-D.; Liu, B. 2013. Studies on vascular infection of *Fusarium oxysporum* F. Sp. cubense race 4 in banana by field survey and green fluorescent protein reporter. *International Journal of Phytopathology*. 2 (1): 44-51.
- Yi, S. Y.; Shirasu, K.; Moon, J. S.; Lee, S. G.; Kwon, S. Y. 2014. The activated SA and JA signaling pathways have an influence on flg22-Triggered oxidative burst and callose deposition. *Plos one*. 9 (2): 951-988.
- Zhao, M. L.; Wang, J. N.; Shan, W.; Fan, J. G.; Kuang, J. F.; Wu, K. Q.; Li, X. P.; Chen, W. X.; He, F. Y.; Chen, J. Y. 2013. Induction of jasmonate signalling regulators MaMYC2s and their physical interactions with MalCE1 in methyl jasmonate-induced chilling tolerance in banana fruit. *Plant, cell & environment*. 36 (1): 30-51.