



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE GENES PR
(PATHOGENESIS RELATED) EN HOJAS DE *VASCONCELLEA*
STIPULATA INFECTADAS CON *FUSARIUM OXYSPORUM*.**

AUTOR: HEREDIA GUZMÁN, MAYRA JOHANA

DIRECTOR: NOCEDA ALONSO, CARLOS MARÍA PhD

SANGOLQUÍ

2018



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*Análisis transcripcional de genes PR (Pathogenesis Related) en hojas de Vasconcellea stipulata infectadas con Fusarium oxysporum*” fue realizado por la señorita **Heredia Guzmán, Mayra Johana** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 03 de diciembre del 2018

Noceda Alonso Carlos María, Ph.D

C. C.: 0959627662



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Heredia Guzmán, Mayra Johana**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *“Análisis transcripcional de genes PR (Pathogenesis Related) en hojas de Vasconcellea stipulata infectadas con Fusarium oxysporum”* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas. Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 03 de diciembre del 2018

Mayra Johana Heredia Guzmán

C.C.: 1723450977



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **Heredia Guzmán, Mayra Johana**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “*Análisis transcripcional de genes PR (Pathogenesis Related) en hojas de Vasconcellea stipulata infectadas con Fusarium oxysporum*” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 03 de diciembre del 2018

Mayra Johana Heredia Guzmán

C.C.: 1723450977

DEDICATORIA

A mi familia y seres queridos,
que con paciencia y apoyo incondicional
me encarrilaron sobre mis objetivos
hasta llegado este día.
Espero que puedan ver sus esfuerzos
reflejado en ello.

Al conocimiento, porque la información
es el nuevo recurso de las naciones.

A mi tierra natal, el Ecuador
porque siempre habrá algo que mejorar
y gente dispuesta a ello.

Y al destino, que me permitió escuchar
a un Walt Whitman decir:
“In the mystical moist might air
and from time to time,
look’d up in perfect silence
at the stars”.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres Olivero Heredia y Martha Guzmán, por haberme apoyado a seguir esta carrera y acompañarme en las prolongadas horas de estudio que se tomaban hasta noches enteras, y gracias a mi hermana por ser un ejemplo de persona, que demostró muchas veces que el mejor aliado que tienes eres tú mismo y que estamos en una constante lucha por ser mejores.

Gracias a quienes considero mi equipo de trabajo, la Dra. Karina Proaño, Dra. Ligia Ayala, Dr. Carlos Noceda, Dr. Christian Peña, Mat. Pedrito Romero y Gaby, excelentes guías para llevar a cabo este proyecto, y razón por la que siempre digo que la calidad de la Carrera de Biotecnología se la deben a sus docentes. A Anita, Diego, Shirley, Alexis y Christian, grandes amigos y compañeros de laboratorio, a quienes deseo muchos éxitos siempre.

Agradezco a mis amigos Dayana, Marco, Carolina, Mishell, Byron, las mininas Helen, Belen y Sofía, y Divertiamigos que me acompañaron todos estos años poniendole alegría a mis días y siendo un hombro de apoyo ante cualquier problema, los quiero mucho.

A Damian, por enseñarme que en lo que hagas debes darlo todo, y la perfección es una utopía que debemos aspirar. Estoy feliz por el destino de haberte conocido.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTADO DE FIGURAS	ix
LISTADO DE TABLAS	xi
LISTADO DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del Problema	1
1.2. Justificación del Problema	3
1.3. Objetivos de la Investigación	6
1.3.1. Objetivo General	6
1.3.2. Objetivos Específicos	6
1.4. MARCO REFERENCIAL	6
1.4.1. <i>Vasconcellea</i>	6
1.4.1.1. Jigacho (<i>Vasconcellea stipulata</i>)	7
1.4.1.1.1. Características botánicas de Jigacho	7
1.4.1.2. Babaco (<i>Vasconcellea x heilbornii</i>)	8
1.4.1.2.1. Características botánicas del Babaco	9
1.4.2. <i>Fusarium oxysporum</i> y marchitez vascular	11
1.4.3. Respuesta defensiva de plantas contra hongos fitopatógenos	13
1.4.3.1. Defensa constitutiva	13
1.4.3.2. Defensa Inducida	14
1.4.3.3. Respuesta sistémica de defensa	15
1.4.3.3.1. Vía del ácido salicílico	15
1.4.3.3.2. Vía del Ácido jasmónico	19
1.4.3.3.3. Vía del Óxido Nítrico	21

1.4.3.3.4. Interacciones entre las vías del AS y AJ/Etileno.	24
1.4.4. Genes Relacionados con la Patogénesis (PR)	25
1.4.4.1. Proteínas PR de acción antifúngica.....	26
1.4.5. Cuantificación de la severidad de enfermedades foliares	33
1.4.5.1. Clave de Evaluación de la Enfermedad (Disease assessment key)	33
1.4.5.1. Fluorometría de Clorofila	34
1.4.6. Técnicas Moleculares.....	36
1.4.6.1. Extracción de ARN	36
1.4.6.2. Trascrición Reversa.....	37
1.4.6.3. PCR Convencional.....	38
1.4.6. Genes de expresión constitutiva (housekeeping genes).....	38
1.4.6.1. NADH deshidrogenasa 5	39
1.4.7. Hipótesis.....	40
CAPÍTULO II: METODOLOGIA.....	41
2.1. Participantes.....	41
2.2. Zona de Estudio	41
2.3. Duración de la Investigación.....	41
2.4. Metodología	42
2.5. Material Vegetal.....	42
2.6. Aislamiento del hongo y preparación de la Solución de Esporas	42
2.7. Establecimiento de un sistema de infección en cámara húmeda	43
2.7.1. Sistema de Infección en hoja desprendida.....	43
2.7.2. Análisis estadístico de datos	45
2.8. Experimento 1: Ensayo de Expresión de Genes PR en hojas desprendidas de Jigacho infectadas con <i>Fox</i>	46
2.8.1. Sistema de infección en hoja desprendida	46
2.8.2. Extracción de ARN	47
2.8.2.1. Método de extracción por columnas con el kit GeneJET Plant RNA Purification®	47
2.8.2.2. Método de extracción fenol-cloroformo con Trizol®	48
2.8.3. Cuantificación y análisis de calidad de ARN.....	49
2.8.3.1. Cálculo de los ratios 260/280 en ARN total	49

2.8.4. Síntesis de ADNc	50
2.8.5. Amplificación de genes PR y <i>housekeeping</i> por PCR convencional.....	51
2.8.5.1. Diseño de cebadores	51
2.8.5.2. Amplificación de ADNc	52
2.8.5.3. Análisis densitométrico de los resultados de PCR	54
2.8.6. Análisis estadístico de datos	55
2.9. Experimento 2: Ensayo Hormonal y de Patogénesis en hojas desprendidas de babaco y jigacho infectadas con <i>Fox</i>	56
2.9.2. Análisis estadístico de datos	57
CAPITULO III: RESULTADOS	60
3.1. Establecimiento de un sistema de infección en cámara húmeda	60
3.2. Diseño de cebadores y estandarización	62
3.2.1. Estandarización de temperatura de hibridación	63
3.2.2. Estandarización de ciclos	64
3.2.3. Amplificación de los genes en ADN	65
3.3. Experimento 1: Ensayo de Expresión de Genes PR en hojas desprendidas de Jigacho infectadas con <i>Fox</i>	66
3.3.1. Extracción y cuantificación de ARN.	66
3.3.2.1. Homogeneidad del gen de expresión constitutiva (<i>housekeeping</i>).	68
3.3.2.2. Expresión de genes PR.....	69
3.4. Experimento 2: Ensayo Hormonal y de Patogénesis en hojas desprendidas de babaco y jigacho infectadas con <i>Fox</i>	73
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	76
5.1. Sistema de infección en hoja desprendida en cámara húmeda	76
5.2. Susceptibilidad del babaco a <i>Fusarium oxysporum</i>	77
5.3. Perfil de expresión de genes de respuesta en la defensa contra <i>Fusarium oxysporum</i>	78
5.4. Papel que desempeñan las hormonas vegetales en hojas de babaco y jigacho infectadas con <i>Fusarium oxysporum</i>	80
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	84
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	85
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	86

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Planta de babaco con síntomas de marchitez vascular.	13
Figura 2: Síntesis de ácido salicílico por la vía del Isocorismato (IC) y de la Fenilalanina (PAL).	17
Figura 3: Vía octadecanoica y hexadecanoica para la síntesis de ácido jasmónico.....	20
Figura 4: Áreas para el determinar el ratio 260/280 a partir de sus densidades absolutas.	50
Figura 5: Análisis de densidad de bandas en ImageJ.....	54
Figura 6: Tratamientos para evaluar la influencia de inductores hormonales sobre hojas de Vasconcellea infectadas con Fox.	58
Figura 7: Resultados del diseño de un sistema de infección en hoja desprendida.....	61
Figura 8: Observación al microscopio (40x) de microconidios y clamidosporas extraídos una muestra con el método B. en babaco.....	62
Figura 9: Electroforesis de productos de PCR en gradiente.	64
Figura 10: Estandarización de número de ciclos.	65
Figura 11: Electroforesis de productos de los cebadores diseñados para PR2, GSNOR, NAD5 y PR13 en ADN genómico de jigacho.	66
Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN extraídas con el método de columnas <i>GeneJET Plant RNA Purification Kit</i> ®.	67
Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN extraídas con el método de <i>Trizol</i> ®.	67
Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen NAD5 sobre muestras de ADNc de jigacho.....	68

- Figura 15:** Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen PR2 en muestras de ADNc de jigacho infectadas con Fox y sus controles sin infección a diferentes periodos de tiempo.....70
- Figura 16:** Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen PR13 en muestras de ADNc de jigacho infectadas con Fox y sus controles sin infección a diferentes periodos de tiempo.70
- Figura 17:** Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen GSNOR en muestras de ADNc de jigacho infectadas con Fox y sus controles sin infección a diferentes periodos de tiempo.71
- Figura 18:** Diagrama de barras de los niveles de expresión de los genes PR2 (A), PR13 (B) y GSNOR (C) en jigacho con su respectiva desviación estándar.72
- Figura 19:** Diagrama de dispersión con líneas de los valores de Fv/Fm tomados de los tratamientos con diferentes inductores hormonales y no hormonales en diferentes días post infección (dpi).73

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: <i>Indice de severidad y significado de cada valor</i>	44
Tabla 2: <i>Variables del establecimiento del sistema de infección</i>	45
Tabla 3: <i>Parámetros seleccionados para el diseño de cebadores para PCR</i>	51
Tabla 4: <i>Composición de una reacción de PCR utilizando DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)</i>	52
Tabla 5: <i>Programación del termociclador para realizar PCR gradiente</i>	53
Tabla 6: <i>Tratamientos para el análisis de transcritos de genes de defensa en hojas de jigacho infectadas con Fox</i>	55
Tabla 7: <i>Variables del primer experimento</i>	55
Tabla 8: <i>Variables del segundo experimento</i>	58
Tabla 9: <i>Medias correspondientes a los diagramas de caja de los valores de IS bajo diferentes métodos de infección con Fox en hojas de babaco y jigacho</i>	60
Tabla 10: <i>Características de los cebadores de los genes a ser analizados</i>	63
Tabla 11: <i>Características termodinámicas de los cebadores diseñados</i>	63
Tabla 12: <i>Características de los modelos de ajuste sobre datos de los tratamientos con diferencias significativas</i>	74

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AJ: Ácido Jasmónico

ARN: Ácido Ribonucleico

AS: Ácido Salicílico

Er: Error relativo

Fox: Fusarium oxysporum

FSII: Fotosistema II

Fv/Fm: Eficiencia cuántica máxima del Fotosistema II

GSNO: glutatión S-nitrosilado

GSNOR: glutatión S-nitrosilado reductasa

IS: Índice de Severidad de la Enfermedad

LOX: Lipoxigenasa

NO: Óxido Nítrico

NR: Nitrato Reductasa

NRTC: Control sin retrotranscripción

PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern

PR: Pathogenesis Related

PRR: Pattern Recognition Receptors

PTC: Control *plateau*

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

SAR: Resistencia Sistémica Adquirida

UE: Unidad Experimental

RESUMEN

La familia *Vasconcellea* es la más amplia de su género, comprende especies cultivables como el babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo), un híbrido partenocárpico el cual se produce en los valles cálidos de la sierra ecuatoriana, y especies silvestres como el jigacho (*Vasconcellea pubescens*), conocido por ser uno de los progenitores del babaco, el cual a pesar de no tener atractivo comercial ha presentado indicios de resistencia ante múltiples enfermedades. La susceptibilidad del babaco a enfermedades tales como la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* en contraste a la resistencia que muestra el jigacho, dan lugar a que en este estudio se compare la respuesta de cada una de estas especies frente a la infección. Con este objetivo se realizaron dos ensayos, el primero consiste en la evaluación de la expresión de genes de cada una de las vías de los inductores hormonales y genes PR (Pathogenesis related) pertenecientes a la vía del AJ y AS mediante análisis semicuantitativos. En el segundo ensayo se realizó la cuantificación de la infección fúngica en hojas de ambas especies colocadas en un sistema de infección en cámara húmeda tras la aplicación de inductores hormonales (ácido jasmónico; AJ, ácido salicílico; AS, etileno y nitroprusiato) y una solución de microsporas de *F. oxysporum*. A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes PR y GSNOR, los resultados de fluorescencia de la clorofila sugieren que la aplicación de AJ o AJ/et propició la diseminación del hongo por la hoja, suprimiendo la acción del AS y la inducción de la respuesta hipersensible.

Palabras clave:

- GENES PR
- *Fusarium oxysporum*
- *Vasconcellea stipulata*
- *Vasconcellea x heilbornii*.

ABSTRACT

The *Vasconcellea* family is the broadest of its kind, comprising cultivable species such as babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. *Pentagona Badillo*), a parthenocarpic hybrid which is produced in the warm valleys of the Ecuadorian highlands, on the other hand are wild species such as jigacho (*Vasconcellea pubescens*), known to be one of the progenitors of babaco, which despite not having commercial appeal has shown signs of resistance to multiple diseases. The susceptibility of babaco to diseases such as vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum*, in contrast to the resistance shown by the jigacho, gives rise to this study for understanding the response of each of these species against the infection. With this objective, two trials were carried out, the first consisting of the evaluation of the expression of genes from each of the pathways of the hormonal inducers and PR (*Pathogenesis related*) genes belonging to the AJ and AS pathway through semiquantitative analysis. In the second test, the fungal infection was quantified in leaves of both species placed in a wet chamber infection system after the application of hormonal inducers (jasmonic acid, AJ, salicylic acid, AS, ethylene and nitroprusside) and a solution of microspores of *F. oxysporum*. Although no significant differences were found in the expression of the PR and GSNOR genes, the fluorescence results of chlorophyll suggest that the application of AJ or AJ / et propitiated the spread of the fungus by the leaf, suppressing the action of AS and the induction of the hypersensitive response.

Key words:

- PR GENES
- *Fusarium oxysporum*
- *Vasconcellea stipulata*
- *Vasconcellea x heilbornii*.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del Problema

El babaco (*Vasconcellea x heilbornii* var. pentagona Badillo) es un híbrido interespecífico cuyo origen se considera que está localizado en la zona central sur de Ecuador, donde sus progenitores (*Vasconcellea pubescens* y *Vasconcellea stipulata*) crecen a altitudes de 1600-2800 msnm (Robles, Salinas, & Armijos, 2014). Debido a las características atractivas de sus frutos en sabor y aroma, y a su valor nutricional es cultivado para su comercio en los valles interandinos, lo que se realiza a cielo abierto y bajo invernadero a temperaturas de 14-20°C (Soria, 1997).

Se calcula que en Ecuador hay 180 ha de babaco sembradas, 60% de las cuales están en la provincia de Tungurahua (El Comercio, 2011) y poseen un rendimiento de 200 a 250 t/ha en su periodo de vida bianual. Los productores obtienen una utilidad de 12-15 USD por caja de fruto babaco (25 lb/caja en el caso del babaco de acuerdo al MAGAP) (El Comercio, 2011), lo que supone un rubro de entre 38 a 47 millones USD anuales para los agricultores, lo que se transformaría en pérdidas si los cultivos fueran arrasados por las adversidades ambientales.

El cultivo de babaco presenta dificultades que se relacionan con la susceptibilidad de la planta a factores bióticos y abióticos, lo cual ha limitado su expansión comercial. En especial, la facilidad con la que esta planta es afectada por enfermedades y plagas es un reto a superar para poder aprovechar su potencial (Soria, 1997).

Entre las enfermedades más importantes que atacan a los cultivos de babaco se encuentra la marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum* Schltdl. El primer reporte oficial de marchitez vascular en babaco en Ecuador es el de Ochoa y Fonseca (Ochoa & Fonseca, 2000),

quienes describieron la aparición de *F. oxysporum* en cultivos de babaco devastados en 1996. En dicho reporte se incluyó la descripción de síntomas, aislamiento del patógeno y morfología de colonias fúngicas y conidios.

Posteriormente, ensayos de patogenicidad con distintas cepas de *F. oxysporum* en condiciones de invernadero corroboraron la susceptibilidad del babaco. Los resultados revelaron diferentes grados de severidad de la enfermedad en correspondencia a los niveles de necrosis observados (Robles, Gómez, & Macas, 2014).

El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* Schldtl está ampliamente distribuido en los suelos desde el punto de vista geográfico, incluyendo países como el Ecuador (Pacin et al., 2003). Este hongo perjudica los cultivos mediante la invasión y devastación de los tejidos vasculares, y puede llegar a constituir entre el 8 y el 10 % del total de la biota fungosa del suelo (Fernández, 1979). En el caso de Ecuador, la expansión del patógeno que condujo a la devastación del cultivo de babaco ocurrida en 1996 se debió al desconocimiento del microorganismo, el intercambio de material vegetativo entre distintas zonas productoras, la falta de estrategias de control de la enfermedad y los métodos de propagación (Ochoa & Fonseca, 2000).

Los procesos de diversificación y adaptación de los patógenos dan lugar a variedades específicas (formae speciales, ff. spp.) para ciertas plantas, así como por ejemplo *F. oxysporum* f.sp. *cubense* el cual ataca a musáceas, o *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* el cual afecta a tomate, por lo cual la infección en hospederos de importancia económica como *Cucumis melo* (Estrella, 2001), *Solanum lycopersicum* (González, Arias, & Peteira, 2012), o diversas especies *Musaceae* (Carr et al., 2017) están caracterizadas de manera particular. Actualmente, es escasa la información sobre la infección de fusarium en cultivos del género *Vasconcellea*. Al agente causal específico de babaco se lo clasificó

como f. sp. *caricae* y en 2004 se lo cambió a f. sp. *vasconcellae* a razón de la reclasificación de la familia hospedadora *Caricaceae* (Argotti, Cazar, Motte, & Cedeño, 2011).

Entre las tentativas para obtener plantas de babaco resistentes a *Fusarium* se halla la inoculación de *Trichoderma* spp. en injertos con papaya hawaiana. Tanto la aplicación de *Trichoderma* como el injerto contribuyeron al crecimiento normal de la planta sin ser afectada por *F. oxysporum*; sin embargo, patógenos como *Phytophthora palmivora* y bacterias del suelo reducen la eficiencia de esta aplicación (Cueva, 2007).

Una redirección de estos esfuerzos para entender la infección a nivel molecular, o el estudio de los progenitores del babaco, los cuales se presume que son resistentes a varias enfermedades podría arrojar alternativas para el desarrollo de herramientas de mitigación de la marchitez vascular causada por *F. oxysporum* que puedan ser aplicables en el campo.

1.2. Justificación del Problema

Los agricultores locales ven con optimismo la producción de babaco a gran escala que se realiza en invernadero y/o con técnicas de cultivo tradicionales (Viteri, 1992). En tales condiciones, las plantaciones de babaco son afectadas tanto por fusariosis como por mancha negra de hoja, oidium, tizón o antracnosis, produciendo pérdidas económicas (Helmuth, 2000). Lo cual ha impulsado investigaciones para potenciar la producción de este cultivo en los últimos años; por ejemplo, INIAP ha emitido manuales para la siembra de babaco así como para la prevención y tratamiento de problemas fitosanitarios basándose en tratamientos químicos que deben ser aplicados en suelo y estacas (Helmuth, 2000).

Por otro lado, estudios del INIAP con respecto al método de injertación de babaco determinaron una resistencia exitosa utilizando como porta-injertos la especie *V. cundinamarcensis* var. Badillo

cv. “024” (chamburo) y la especie *V. stipulata* var. Badillo (toronche), basándose en la ausencia de síntomas de marchitez vascular de babaco después de cuatro meses de observación (García, 2011). Considerando que este método requiere de una planta adicional para el injertado del babaco, el costo de la producción aumenta por cada planta, y la retribución económica para el agricultor se reduce significativamente.

Acompañado del uso de portainjertos, la alternativa más atractiva para los agricultores es el control químico mediante pesticidas que incluye el uso de benzimidazoles, como son el benomil (metil-1-(butilcarbomilo) benzimidazol-2il-carbamato), carbendazim, tiabendazol y tiofanato, que si bien han resultado eficaces en la eliminación del hongo del suelo, podrían generar toxicidad en la planta, como se ha demostrado en el caso de benomil aplicado a raíces de cebolla (*Allium cepa*) (Dane & Dalgiç, 2005).

En vista de esto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de control contra *Fusarium*, eficaces a largo plazo, de bajo costo para los productores, y sin efectos adversos posteriores.

La búsqueda de cultivares resistentes a hongos se ha llevado a cabo en diversas especies. Sin embargo, la rápida evolución de los linajes virulentos de *F. oxysporum* conlleva a reiterar periódicamente la búsqueda de cultivares resistentes (Swarupa, Ravishankar, & Rekha, 2014). Por otro lado, la aplicación de antagonistas al hongo puede generar una presión negativa sobre este y quitarle dominio sobre la planta, pero también debe ser capaz de dominar la rizosfera (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Otra propuesta desde un punto de vista más molecular implica el estudio de la infección para dar a conocer los genes de avirulencia (Li, Chen, et al., 2011; Yang, Dong, & Wang, 2011), toxinas

(Li, Li, Yu, & Huang, 2011) y métodos moleculares de detección específica del patógeno (Wang, Peng, Dai, Deng, & Huang, 2007), lo cual permite diseñar estrategias de mitigación y control de la enfermedad como la producción de variedades resistentes, control por inducción de la resistencia mediante hormonas y elicitores, control biológico con microorganismos antagonistas y prácticas culturales (Birun & Huifang, 2017).

La modulación de la compleja red defensiva de la planta ante el ataque de un patógeno se basa en interacciones moleculares entre ambos. Tanto el ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y óxido nítrico están relacionados con vías bioquímicas de respuesta defensiva de las plantas (Kunkel & Brooks, 2002).

Puesto que el jigacho ha presentado resistencia a *F. oxysporum* en ensayos realizados por el INIAP (García, 2011), puede servir como referencia para determinar las características que confieren resistencia a *F. oxysporum* de las cuales el babaco carece. El presente estudio propone la comparación de las respuestas de jigacho (*V. stipulata*) y babaco, tras la aplicación de inductores hormonales e infecciones con *F. oxysporum*.

Para definir cuál de las vías de inductor hormonal (ácido jasmónico, ácido salicílico, u óxido nítrico) que genera la respuesta bioquímica más efectiva contra *F. oxysporum* deben evaluarse indicadores que reflejen el avance o limitación de la enfermedad. Este estudio evaluará indicadores fenotípicos de enfermedad y moleculares de defensa en plantas de jigacho y babaco infectados con *F. oxysporum*. Los resultados obtenidos podrán ser usados como referencia para la ayuda en la selección de tratamientos efectivos que induzcan la respuesta deseada en cultivos de babaco mediante la aplicación de elicitores o directamente mediante la aplicación hormonas vegetales.

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

Determinar la influencia de inductores hormonales sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* en *Vasconcellea x heilbornii* var. Pentagona Badillo y analizar la variación transcripcional de genes relacionados con la patogenicidad en *Vasconcellea stipulata*.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Establecer un sistema experimental en hoja para el estudio de la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* sobre una especie susceptible (babaco).
- Realizar estudios semicuantitativos de transcripción de genes relacionados con la patogenicidad (PR) durante la infección con *F. oxysporum* sobre una especie resistente (jigacho).
- Determinar qué genes relacionados con la patogenicidad se sobreexpresan ante el ataque de *Fusarium oxysporum* y la vía defensiva asociada a estos en *Vasconcellea stipulata*.
- Evaluar los efectos patogénicos de *Fusarium oxysporum* en *Vasconcellea x heilbornii* var. Pentagona Badillo en presencia de inductores hormonales.

1.4. MARCO REFERENCIAL

1.4.1. *Vasconcellea*

El género *Vasconcellea* pertenece a la familia Caricaceae, un grupo de dicotiledóneas con seis géneros en total; que a excepción de un género localizado en África se distribuyen ampliamente en América del Sur. Además, *Vasconcellea* contiene 21 de las 35 especies de la familia *Caricaceae*, convirtiéndolo en el más abundante (Van Droogenbroeck et al., 2004).

En Ecuador se encuentran 16 de esas 21 especies, y se concentran mayoritariamente al sur del país, en la provincia de Loja (Romejin-Peeters, 2004). Muchos de sus frutos pueden ser recogidos de la naturaleza para el consumo o, como en el caso del babaco, son cultivables a escala comercial.

La mayor parte de las especies de este género son semileñosas arbustivas, de tallo medular (diferiendo del tallo de las del género *Carica*) simple o escasamente ramificado, con hojas enteras, lobuladas y acorazonadas concentradas en una corona terminal. Las flores son pentámeras con pétalos de color blanco, verde, amarillo, naranja o rosado, y pueden ser masculinas, femeninas o hermafroditas (Badillo, 1993; Soria & Viteri, 1997).

1.4.1.1. Jigacho (*Vasconcellea stipulata*)

El jigacho (*Vasconcellea stipulata*), también llamado toronche. Prospera en forma silvestre entre 1500 y 2500 msnm, y dentro del Ecuador se la encuentra en estado natural en los valles interandinos como los de Ibarra, Guayllabamba, Tumbaco, Los Chillos, Amaguaña o San Miguel de Bolívar (Fabara, Bermeo, & Barberán, 1985).

1.4.1.1.1. Características botánicas de Jigacho

El jigacho es una planta glabra arbustiva y arbórea de hasta 10 m de altura, con tronco de hasta 50 cm de diámetro, que a veces ramifica en la parte superior. Sus hojas son glabras, pentalobuladas, tienen de 30 a 40 cm de diámetro y desaparecen durante la floración (Badillo, 1993). Pero la característica fundamental para diferenciar esta especie es la presencia de estípulas espiniformes ubicadas a cada lado en el tallo, que tienen una longitud de 1 a 3 mm (Badillo, 1993).

Esta planta posee inflorescencias masculinas y femeninas, siendo las masculinas densas, sésiles o subsésiles de color anaranjado y verdosas hacia abajo, mientras que las inflorescencias femeninas

son cortas, con péndulo de 1 cm de longitud aproximadamente y con flores de 17 a 22 mm de longitud y de color verde claro brillante (Badillo, 1993).

Los frutos son externamente de color amarillo o verde y superficie arrugada, con una pulpa de aroma ligero y sabor acidulado (García, 2011). Son de forma elipsoidal, de 8-10 cm de largo y 4-6 cm de diámetro, trancos en la base y atenuados desde la mitad hacia el ápice, con diez surcos más o menos profundos (Badillo, 1993).

A pesar de que es un frutal sin lugar en el mercado de alimentos, se consideró como una alternativa para el manejo de la fusariosis al usarse como portainjertos de babaco, después de que el INIAP probara diferentes vasconcelleas como portainjertos y observara que el portainjerto del jigacho previene la aparición de síntomas de marchitez al infectar las raíces del portainjerto con clamidosporas de *F. oxysporum* (García, 2011).

1.4.1.2. Babaco (*Vasconcellea x heilbornii*)

El babaco (*Vasconcellea x heilbornii*) es un híbrido natural, que se generó en los valles interandinos de la provincia de Loja. Este híbrido muestra partenocarpia por lo que es generalmente propagado por medios clonales (Badillo, 1993). De acuerdo a Badillo (Badillo, 2001) se pueden distinguir dos variedades (*V. x heilbornii* var. *chrysopetala* y *V. x heilbornii* var. *fructifragrans*) y un cultivar (*V. x heilbornii* ‘Babaco’).

El primer perfil taxonómico del babaco fue dado por Heilborn en 1922, quien le asignó el nombre de *Carica pentagona* por creer que se trataba de una nueva especie. Actualmente la clasificación taxonómica del babaco es: Reino *Plantae*, Subreino *Embryobionta*, División

Magnoliphyta, Clase *Magnoliópsida*, Subclase *Dilleniidae*, Orden *Violales*, Familia *Caricaceae*, Género *Vasconcellea*, Especie *V. x heilbornii* V.M.Badillo (Heilb).

Entre los primeros estudios filogenéticos que relacionaron al babaco con el género *Vasconcellea* se encuentra un análisis de variación de genotipos; que se realizó en muestras de papaya (*Carica papaya*) y 11 especies *Vasconcellea* mediante la técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphisms*) para determinar la variación de una secuencia espaciadora del ADN cloroplástico.

A pesar de que los resultados confirmaron que la papaya está distantemente relacionada con *Vasconcellea*, no mostraron patrones de variación idéntica entre *V. x heilbornii* ‘Babaco’ con *V. stipulata* y *V. pubescens*, dejando sin confirmar la relación parental de estos con el babaco (Aradhya, Manshardt, Zee, & Morden, 1999).

Más tarde, Van Droogenbroek et al. (2002) examinaron un diverso grupo de fenotipos de *V. x heilbornii* mediante análisis AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Los resultados agruparon estos fenotipos con una o ambas especies parentales putativas, respaldando la relación de *V. stipulata* y *V. pubescens* con el babaco y sugiriendo la ocurrencia de continuos eventos de introgresión bidireccional en dichas especies parentales.

1.4.1.2.1. Características botánicas del Babaco

La planta de babaco es un arbusto de hasta cuatro metros de altura. Cuando proviene de estacas las raíces crecen unitarias y son de color marrón claro (Soria & Viteri, 1997). El tallo es erecto, cilíndrico, no leñoso, de color verde en la juventud y marrón grisáceo cuando llega a la adultez en

el que raramente aparecen ramificaciones, pero en el que a menudo aparecen brotes alrededor de la base (Badillo, 1993).

Las hojas son grandes, pueden llegar a medir de 60 a 80 cm y son de color verde. El limbo tiene cinco lóbulos, y presenta nervaduras bien marcadas que se conectan a un largo peciolo que puede medir hasta 30 cm (Badillo, 1993).

Las flores se forman sobre el tronco recién desarrollado durante la fase de crecimiento de la planta; son todas femeninas y usualmente solitarias en cada axila foliar (Badillo, 2000). Los pétalos son de color blanco-amarillo-verdoso y los sépalos verde-oscuros (Fabara et al., 1985).

Los frutos son bayas elipsoidales de color amarillo al llegar a la maduración completa. No necesitan polinización para desarrollarse, puesto que son partenocárpicas y no presentan semillas. Son alargados, de sección pentagonal, de 30 cm de largo y de 6 a 12 cm de diámetro. La pulpa es blanca, jugosa y ligeramente ácida (Soria & Viteri, 1997).

El fruto del babaco es bajo en calorías (21 kcal/100g) en comparación a frutas como la naranja (45 kcal/100g) o la piña (47 kcal/100g), y su cantidad de vitamina C (28 mg/100g) es comparable a la de la piña (24 mg/100g) (Merino, 1989).

El babaco no posee semillas, por lo que su reproducción se realiza asexualmente por partenogénesis, o bien a partir de brotes tiernos, estacas o injertos (Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar, 2003). Sin embargo, esto da lugar a problemas típicos fitopatológicos y a la degeneración de la especie (Freire, 2015).

Entre los agentes fitopatológicos que perjudican a los cultivos de babaco se encuentran nematodos, virus, bacterias y hongos. Este último grupo destaca por su agresividad y por las

pérdidas económicas causadas; uno de los hongos patógenos de babaco más frecuentes es *Fusarium oxysporum*, razón por la que ha sido ampliamente estudiado (Freire, 2015).

1.4.2. *Fusarium oxysporum* y marchitez vascular

El género *Fusarium* es un grupo de hongos ascomicetos filamentosos que incluye varios patógenos de relevancia en la agricultura. Las enfermedades causadas por *Fusarium* incluyen marchitez, rayados, pudrición, y llagas en cultivos hortícolas, ornamentales y forestales, así como en la naturaleza (Desmond, Manners, Stephens, Maclean, & Schenk, 2008).

Las especies del género *Fusarium* fueron agrupadas por Snyder y Hensen en 1940, quienes lo subclasificaron en 9 especies. Una de ellas es *F. oxysporum*, la cual a su vez comprende *formae speciales* (ff. spp) en base a la patogenicidad sobre diferentes especies de plantas. Hasta el momento se han reportado 150 *formae speciales* (Michielse, Van Wijk, & Reijnen, 2009).

F. oxysporum es agente causal de la marchitez vascular; y ha sido identificado en suelos nativos de varias partes del mundo, donde es capaz de crecer como saprófito o como huésped en plantas (Laurence, Summerell, & Liew, 2012).

En la tierra, estos hongos se presentan en estado de dormancia como clamidosporas (Nelson, 1981), forma que le confiere resistencia al ambiente y a la restricción de nutrientes a la cual es sometido por otros microorganismos del suelo, estado también denominado como fungistasis (Garbeva, Gera Hol, Temorshuizen, Kowalchuk, & De Boer, 2014).

Sin embargo, cuando las plantas emiten compuestos orgánicos como azúcares o aminoácidos a través de sus raíces, estimulan la germinación de las esporas del suelo (Schroth & Hildebrand, 1964). Con la diferenciación de las esporas en hifas se desencadena la infección inicial, es decir la

penetración y propagación de las hifas desde las vellosidades radicales, que luego avanza por las raíces, hasta su llegada a los vasos del xilema. Una vez ahí, el micelio se ramifica y produce microconidios, los cuales germinan y perforan el xilema para proceder a la colonización (Ploetz, 2005).

Las plantas infectadas tratan de restringir la colonización hacia la región de entrada inicial del patógeno, mediante la oclusión de vasos por deposición de geles, calosas y tilosas (Takken & Rep, 2010). Sin embargo, en los cultivares susceptibles ocurre la distribución secundaria, donde la colonización continúa cuando los geles y calosas son degradados por el efecto de enzimas pectolíticas del patógeno y la producción de tilosas es inhibida. Los cultivos resistentes sobrellevan esta fase mediante la generación de flavonoides de tipo catequina y de sus productos de oxidación que inactivan las enzimas (Deese & Stahmann, 1962).

El primer síntoma de infección visible internamente es la decoloración y pardeamiento del xilema en regiones no leñosas. Los subsiguientes síntomas incluyen marchitez, clorosis, necrosis y pérdida prematura de hojas que eventualmente conducirán a la muerte de la planta (Figura 1) (Michielse et al., 2009). Factores como la infección por nematodos formadores de agallas, altas temperaturas (27-28°C), tiempo seco y suelo ácido (pH 5-5,6) favorecen el desarrollo de la enfermedad (González et al., 2012).

De acuerdo a la forma en que el hongo afecta la planta se lo puede categorizar como necrotrófico o biotrófico. Se refiere a biotrófico cuando la extensión en la que el hongo afecta a la planta está limitada a la región del apoplasto y no causa daños a las células adyacentes. En cambio, donde la colonización del hongo va acompañada de la muerte de células huésped se lo clasifica como necrotrófico (Olivain & Alabouvette, 1997).



Figura 1: Planta de babaco con síntomas de marchitez vascular.

Nota: A la izquierda se observa externamente la planta con el tallo marchito sino hasta el extremo superior de la rama que ya se halla caída por debilidad. A la derecha se observa un corte transversal de la sección del tallo enfermo con haces vasculares pardeados a causa del hongo.

1.4.3. Respuesta defensiva de plantas contra hongos fitopatógenos

Las plantas responden defensivamente mediante mecanismos físicos y bioquímicos para resistir a la colonización de hongos. Estos mecanismos se clasifican en defensas constitutivas o preformadas, e inducibles ante la presencia del patógeno (Durrant & Dong, 2004).

1.4.3.1. Defensa constitutiva

Las defensas constitutivas son barreras físicas de la planta presentes desde antes del ingreso del patógeno, como resultado de procesos de lignificación, suberización y formación de calosas. Dichas estructuras pueden estar presentes en determinadas etapas, en todo el ciclo biológico de la planta, o incrementarse en respuesta a la infección (Montes, 2009). Un ejemplo es la capa cerosa en la cutícula de algunas hojas, que impide la retención de humedad tras la lluvia que podría propiciar el crecimiento de hongos (Agrios, 2005).

También hay defensas bioquímicas prefabricadas tales como fenoles, ligninas, taninos, saponinas, antocianinas, flavonoides, glucocinatos, lectinas, glucanasas o quitinasas, las cuales poseen actividad tóxica o inhibidora contra el patógeno. En algunos casos, la concentración de la

sustancia química se incrementa sobre los niveles normales ante la presencia de patógenos (Kliebenstein, 2004).

1.4.3.2. Defensa Inducida

La defensa inducida es la respuesta que se presenta después del ataque del patógeno, durante el proceso infectivo. Este tipo de respuesta requiere el reconocimiento del patógeno para activar los mecanismos de defensa y la posterior producción de elicitores, un conjunto de sustancias químicas y factores bióticos que alteran el metabolismo celular; estos se diferencian como un subgrupo de metabolitos secundarios (Durrant & Dong, 2004).

Los metabolitos secundarios son compuestos que, a pesar de no ser esenciales para el funcionamiento de las células individuales, tienen un papel clave en la vida y supervivencia de las plantas (Palacios, 2004). De acuerdo a la ruta biosintética que los genera, los metabolitos se categorizan en terpenos, alcaloides y fenilpropanoides. Por ejemplo, la nicotina, la cafeína y la solanina son alcaloides que actúan como insecticidas, esta última se encuentra en las zonas verdes de la patata, y es tóxica ya que inhibe la acetilcolinesterasa (Salgado, 2012).

Otra manifestación de la defensa inducida es la respuesta hipersensible (RH), que conlleva a la muerte celular localizada en el sitio de la infección con el fin de restringir el avance del patógeno. Este fenómeno es provocado por el ácido salicílico y las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Laloi, Apel, & Danon, 2004).

1.4.3.3. Respuesta sistémica de defensa

Se llama Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) a la expansión de la resistencia a través de los tejidos de las plantas, haciendo que su duración sea prolongada. Esta respuesta se produce ante una amplia variedad de patógenos como virus, hongos, bacterias y oomicetos (Durrant & Dong, 2004).

La reacción sistémica se activa después de la infección por parte de un patógeno necrosante o posterior a la aparición de RH e implica el incremento de la expresión de un gran número de genes que dan lugar a proteínas PR (*Pathogen Related*), las cuales poseen funciones antimicrobianas y señalizadoras como parte de la respuesta (Valarers, 2011). Aunque todos estos factores se producen en plantas enfermas, pueden ser inducidos por factores químicos tales como reguladores del crecimiento como etileno, ácido absísico o ácido indolacético, o varios productos biológicos, así como por factores ambientales como el ozono, la luz y la temperatura (Vidhyasekaran, 2015a).

Las proteínas PR se han clasificado en 17 familias que se localizan intra y extracelularmente. Estas proteínas pueden tener diferentes actividades: glucanasa, peroxidasa, oxalato-oxidasa, quitinasa, ribonucleasa, inhibidora de proteínas. En otros casos, como la familia PR1, su función es aún desconocida (Vidhyasekaran, 2010).

1.4.3.3.1. Vía del ácido salicílico

El ácido salicílico (AS) es un compuesto fenólico que forma parte del grupo de hormonas vegetales (Raskin, 1992a). Fue aislado por primera vez a partir de sauce (*Salix alba*) en forma de polvo cristalino, parcialmente soluble en agua y altamente soluble en compuestos orgánicos (Raskin, 1992b). Su función está relacionada con la regulación de diversos procesos metabólicos de la planta (Popova, Pancheva, & Uzunova, 1997).

El AS puede ser sintetizado a través de diferentes rutas metabólicas, la de la fenilalanina (Sawada, Shim, & Usui, 2006) o la del isocorismato (Garcion et al., 2008).

En la vía de la fenilalanina (Figura 2), la síntesis de AS se realiza a partir del ácido cinámico, y puede seguir dos rutas. La primera comprende la descarboxilación directa del ácido cinámico, mientras que la segunda implica la hidroxilación del ácido trans-cinámico previa a la descarboxilación. El proceso de descarboxilación puede ocurrir por β -oxidación o por acortamiento no oxidativo de cadena. En todos los casos el producto es el ácido benzoico el cual por hidroxilación en el sitio C-2 da lugar al AS (Chong et al., 2001; Lee, León, & Raskin, 1995).

Cuando la síntesis de AS procede por la vía del isocorismato (Figura 2), primero ocurre la transformación de corismato a isocorismato por acción de la enzima isocorismato sintasa, y luego este es transformado a AS con ayuda de la proteína isocorismato piruvato liasa (Strawn et al., 2007).

Una vez sintetizado, el AS actúa como modulador de funciones de la planta tales como crecimiento en masa, producción de clorofila, cierre de estomas, asimilación de nitratos, inhibición de la producción de etileno, inducción del florecimiento y defensa (Hayat, Fariduddin, Ali, & Ahmad, 2005).

White (1979) fue el primero en reportar la participación del AS en la resistencia de las plantas a enfermedades, mediante experimentos donde aplicaba aspirina (ácido acetyl salicílico) ó AS directamente sobre hojas de tabaco de una línea resistente (*N. tabacum* cv. Xanthi-nc) y observó el incremento endógeno de proteínas PR y un aumento de la resistencia por la reducción de hasta un 90% del número de lesiones causadas por el virus de mosaico del tabaco.

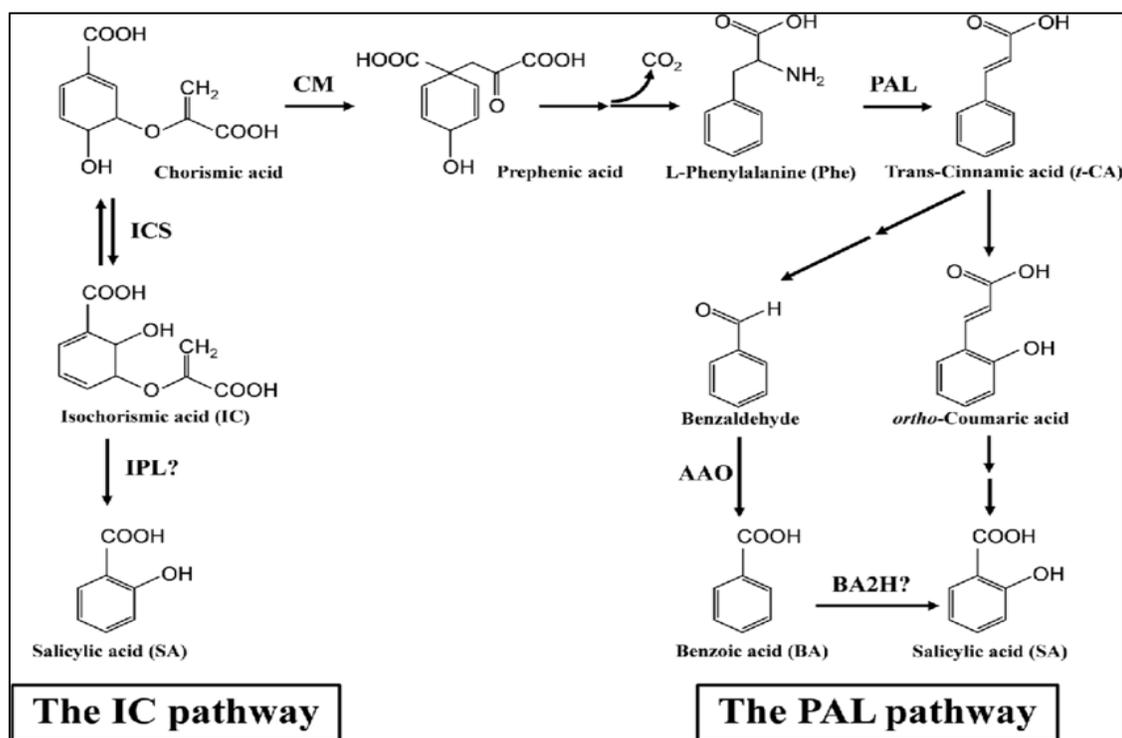


Figura 2: Síntesis de ácido salicílico por la vía del Isocorismato (IC) y de la Fenilalanina (PAL).

Nota: Las abreviaturas indican las enzimas: AAO aldehyde oxidase, BA2H benzoic acid 2-hydroxylase, CM chorismate mutase, ICS isochorismate synthase, IPL isochorismate pyruvate lyase, and PAL phenylalanine ammonia-lyase. Fuente: Chong et al., 2001.

Los elicitores del AS conocidos hasta ahora comprenden proteínas activadas por la presencia de ROS, por ejemplo, las proteínas PAD4, EDS1, EDS4, EDS5 y SID2 (Vidhyasekaran, 2015b). También se determinó que la ruta del AS es la respuesta que da lugar a la RH y producción de ciertas proteínas PR, asociándose estrechamente al ataque de ciertos patógenos y factores abióticos (Falk et al., 1999).

Estudios genéticos han mostrado que además se requiere AS para la temprana activación de respuestas defensivas que son mediadas por genes de resistencia que confinan la enfermedad y permiten la evolución de la SAR (Ryals et al., 1996). Incluso plantas que han sido infectadas con

patógenos avirulentos desarrollan resistencia a patógenos sensibles a respuestas mediadas por SA (Durrant & Dong, 2004).

Puesto que los eventos en la señalización de AS incluyen complejos bucles de retroalimentación, sólo se mencionarán ciertos elementos destacados.

El AS induce la expresión de factores de transcripción (FT) para activar genes relacionados con la defensa específicos de esta ruta. La proteína codificada por el gen NPR1 es el regulador más importante en la inducción de genes de la defensa, ya que se une directamente al ácido salicílico en el citoplasma lo cual cambia su conformación y le permite translocarse hacia el núcleo. Al llegar al núcleo actúa como coactivador de los FT TGA (Vidhyasekaran, 2015b).

Hay otros FTs independientes de NPR1, tales como la clase WRKY, un grupo de proteínas que poseen los motivos dedos de zinc WRKY. Los FT WRKY se localizan en el núcleo y reconocen en el ADN secuencias TTGAC(C/T) o caja-W (Zheng, Qamar, Chen, & Mengiste, 2006). Un gran número de genes relacionados con la defensa, incluyendo varios genes PR contienen secuencias caja-W reconocibles por los FT WRKY (Yu, Chen, & Chen, 2001).

Los factores de transcripción WRKY son importantes reguladores de las respuestas de defensa dependientes de AS (Wang, Amornsiripanitch, & Dong, 2003), actuando como reguladores positivos o negativos. WRKY45 es un FT de la vía del AS que al ser expresado constitutivamente en arroz mejoró su resistencia a *Magnaporthe grisea*, un hongo hemibiotrófico causante de la piriculariosis.

La mayoría de genes que se transcriben en respuesta al AS son genes de la respuesta de defensa. Por ejemplo, la transcripción de genes PR tales como PR1 (Xing et al., 2008), PR2 (Hondo et al.,

2007), PR3 (Niki, Mitsuhashi, Seo, Ohtsubo, & Ohasshi, 1998), PR4 y PR5 (Stein et al., 2006) han sido asociados con la vía del AS.

1.4.3.3.2. Vía del Ácido jasmónico

El ácido jasmónico (AJ) es un tipo de hormona vegetal que pertenece al grupo de lípidos oxidados (oxilipinas) derivados de ácido α -linoleico (AL) y se forma en respuesta a daños tisulares causados por patógenos necrotróficos, insectos, herbívoros o estrés mecánico, aunque también se forman durante varios procesos de desarrollo; el bloqueo de esta vía causa un deterioro general de la planta (Erb, Glauser, & Robert, 2002).

La ruta biosintética del AJ o ruta octadecanoica se efectúa en tres compartimentos subcelulares: primero en el cloroplasto, luego en el peroxisoma y finalmente en el citoplasma (Figura 3).

La primera fase inicia con la liberación de moléculas de AL de la membrana del cloroplasto mediante la acción de una fosfolipasa. Dichas moléculas son posteriormente oxidadas por la enzima lipoxigenasa (LOX) y son convertidas en compuestos intermedios estables por acción del aleno óxido sintasa (AOS) y aleno óxido ciclasa (AOC) (Caldelari, Wang, Farmer, & Dong, 2011).

El producto de la primera fase es exportado al peroxisoma, donde ocurre una reducción y subsiguientes β -oxidaciones que conducen a la obtención de AJ. Finalmente, el AJ es transportado al citoplasma donde puede ser modificado por diversas enzimas, para dar lugar a sus formas bioactivas (Fonseca, Adie, Porzel, & Kramell, 2009).

Los jasmonatos llevan a cabo distintas funciones en la planta, como procesos metabólicos, reproducción y defensa contra patógenos e insectos (Setterblad, Vidal, & Palva, 2000), sin embargo nos enfocaremos en esta última.

La función defensiva del AJ fue propuesta por Farmer y Ryan (1992), quienes dieron evidencia de la relación causal entre una herida ocasionada (por insectos herbívoros), la formación de ácido jasmónico y la inducción de genes inhibidores de proteínasa para detener el daño. Otros agentes que inducen esta vía son los patógenos necrotróficos (Glazebrook, 2005).

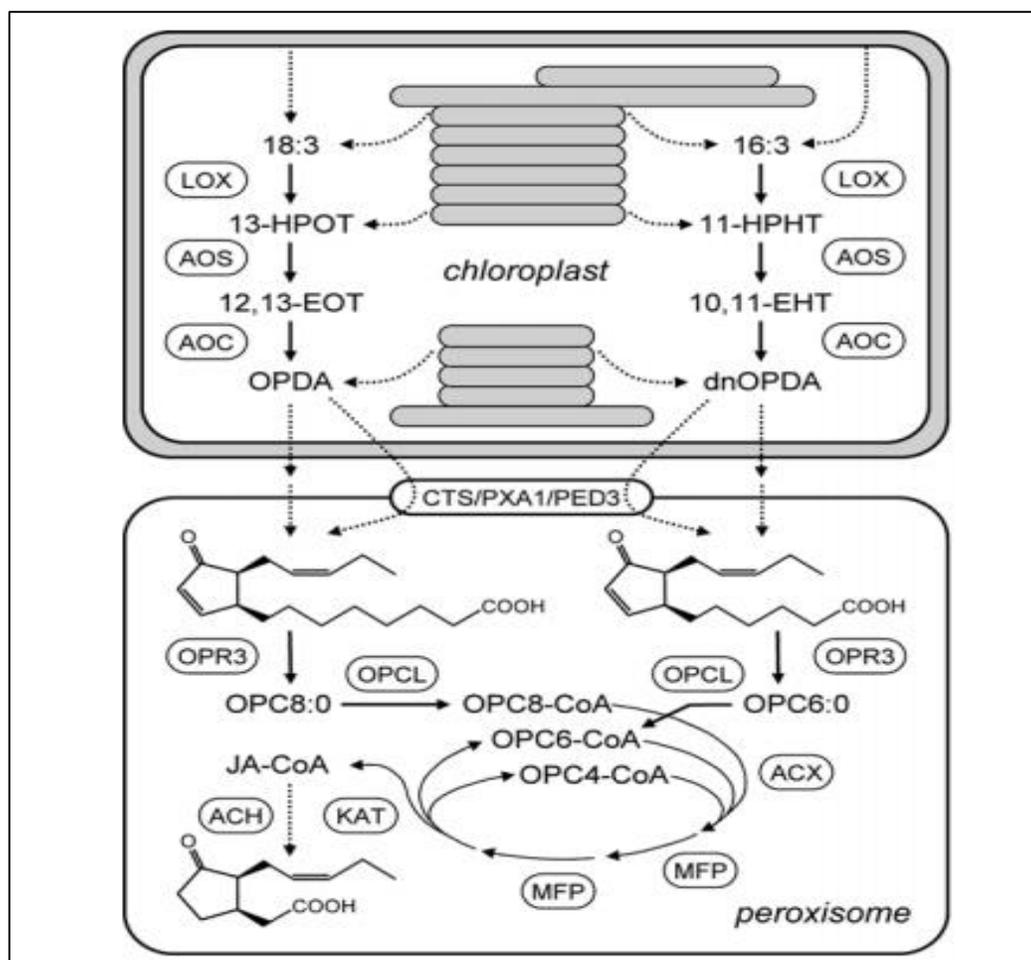


Figura 3: Vía octadecanoica y hexadecanoica para la síntesis de ácido jasmónico.

Nota: Luego de los primeros tres pasos que ocurren en los plástidos se obtiene 12-oxophytodienoic acid (OPDA). Los siguientes pasos dan lugar a la oxidación de OPDA (dnOPDA) a OPC8:0 (OPC6:0) y tres ciclos de B-oxidación para dar lugar al ácido jasmónico. Fuente: Schaller & Stintzi, 2008

Luego de la activación de las proteínas PRR (Pattern Recognition Receptors) de la membrana mediante elicitores tales como daños mecánicos o daños celulares causado por patógenos, se activa la ruta octadecanoica para formación de AJ, el cual es a su vez requerido para la producción de proteínas inhibidoras de proteinasas (PI) y factores de transcripción de genes de la defensa (Narvaez, Florin, & Ryan, 1999). Complementando esta respuesta ocurre la degradación de proteínas inhibidoras del AJ tales como las de la familia JAZ (Woodward & Bartel, 2005).

El AJ es responsable de la acumulación de factores de transcripción pertenecientes a diferentes familias como las de AP2/ERF, bHLH, MYB y WRKY, los cuales regulan la expresión de genes mediante enlaces *cis* al promotor. Entre los genes involucrados con la defensa por la vía del AJ se encuentran genes PR como Pdf1.2 y b-CHI, que son regulados por los factores de transcripción *zipper* bHLH-leu JAMYC/AtMYC2 (Boter, Rivero, Abdeen, & Prat, 2004).

Los genes PDF1.2 codifican péptidos antifúngicos de la familia de las defensinas en plantas (Chang, Cheah, Narasimka, Hasegawa, & Bressan, 1995). Este ha sido establecido como un gen marcador importante en el estudio de la activación de la ruta de señalización del JA/etileno (Zander, La Camera, Lamotte, Métraux, & Gatz, 2009), el AJ induce además la activación de genes para proteínas vegetativas de almacenamiento y la tionina Thi2.1 (PR13) (Ellis & Turner, 2001).

1.4.3.3.3. Vía del Óxido Nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical gaseoso altamente difusible y reactivo. Es una molécula endógena en plantas y animales que participa en la respuesta inmune de estos frente patógenos (Bellin, Asai, Yoshioka, & Delledonne, 2013; Bogdan, 2015). Posee propiedades lipofílicas que le permiten cruzar membranas fácilmente, aunque se desconoce cuán lejos puede difundirse en y entre células. Su reactividad es crucial en su papel de señalización (Bellin et al., 2013).

La síntesis de NO en animales es llevada a cabo por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Se desconoce el homólogo de este gen en plantas, pero cuando se incuban extractos de plantas en un medio con arginina, sustrato de NOS, ocurre la síntesis de NO, por lo cual se sabe que existe una enzima similar cuya actividad requiere de los mismos cofactores (NADPH, calcio, calmodulina, dinucleótido de flavina y adenina, y tetrahidrobiopterina BH_4) (Gaupels, Kuruthukulangarakoola, & Durner, 2011).

El candidato más prometedor es la enzima nitrato reductasa (NR) que actúa tanto en sistemas vegetales así como animales y puede producir NO mediante la reducción de nitritos de manera dependiente de NADPH. De acuerdo a sus propiedades enzimáticas, la eficiencia de su actividad *in vivo* podría estar limitada por altas cantidades de nitratos comparada con la de nitritos (Rockel, Strube, Rockel, Wildt, & Kaiser, 2002).

Se ha observado la participación de la NR en la producción de NO bajo varios contextos fisiológicos, tales como el cierre de estomas inducido por ácido abscísico, hipoxia, bajas temperaturas, o en los nódulos fijadores de nitrógeno (Bellin et al., 2013; Cantrel et al., 2011). La NR también participa en la acumulación de NO durante la respuesta de la planta a patógenos necrotróficos (Perchepped et al., 2010) y bacteria (Oliveira, Justino, Sodek, & Salgado, 2009), o tras la percepción de moléculas elicitoras provenientes de hongos patógenos u otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Rasul et al., 2012).

La producción de NO a partir de nitrito con la enzima NR (K_m 100 μM) baja su eficiencia debido a la concentración de nitrito que compite fuertemente con la cantidad de nitrato (K_i 50 μM) en el medio (Rockel et al., 2002). Razón por la cual hay enzimas para la regulación de los niveles de

NO, de manera que cerciore un balance entre la cantidad de NO sintetizado y la eficiencia en las reacciones que consumen el NO producido.

Sin embargo, la síntesis de NO permanece en un perfil complejo con muchas preguntas sin resolver (Chamizo, Sanz, Llamas, Galvan, & Fernandez, 2016).

De acuerdo a lo investigado hasta el momento, el NO producido puede tener cuatro destinos: nitrosilación de proteínas, depuración en conjunto con las ROS, formación de nitritos o nitratos y síntesis de ácidos grasos nitrogenados (Chamizo et al., 2016). La primera de las funciones mencionadas es la de mayor interés en el presente estudio.

El proceso de nitrosilación de proteínas es una modificación post-transcripcional de proteínas que consiste en la unión de un grupo NO al grupo tiol de una cisteína para formar una molécula S-nitrosotiol (SNO). Este tipo de modificación modula la actividad enzimática (Yun et al., 2011), localización de proteínas (Tada et al., 2008) e interacciones proteína-proteína (Hara et al., 2006).

El grupo NO implicado en la S-nitrosilación proviene de la reacción del NO con el glutatión (GSH) para producir glutatión S-nitrosilado (GSNO), el cual es considerado reservorio de NO y el cual provee la señal para la nitrosilación de proteínas (Ortega-Galisteo, 2012).

Para regular este proceso, la proteína GSNO reductasa (GSNOR) metaboliza el GSNO y produce glutatión disulfido (GSSG) y amonio (NH_3), reduciendo de esta manera las reservas de NO, y en consecuencia disminuyendo la cantidad de proteínas SON (Ortega-Galisteo, 2012). Se ha observado que la ausencia de GSNOR compromete la protección basal y la resistencia mediada por genes R (*Resistance*). La reducción de la actividad de la GSNOR produce acumulación de SNO

intracelular lo cual provoca susceptibilidad a enfermedades en la planta (Feechan, Kwon, & Yun, 2005).

El NO es un mediador clave para la rápida inducción de la señalización del sistema inmune de la planta (Bellin et al., 2013). Se ha reportado que la acción del NO ocurre previa al sistema de señalización del AS que eventualmente activa la transcripción de genes de defensa (Durner, Wendehenne, & Klessig, 1998) y que además induce la producción de fenilalanina amonio liasa, una enzima clave en la biosíntesis de SA (Neill, Desikan, Clarke, Hurst, & Hancock, 2002).

El NO es una señal redox-activa clave de la activación de respuestas de defensa dependientes de SA, por ejemplo las proteínas NPR1 y TGA1 que son reguladores esenciales de la activación de la SAR mediada por AS (Lindermayr, Sell, Müller, Leister, & Dumer, 2010).

1.4.3.3.4. Interacciones entre las vías del AS y AJ/Etileno.

Las interacciones entre las vías del AS y AJ/Et han sido variadas, pero predominan los casos en los que se ha observado antagonismo mutuo entre ellas.

El antagonismo entre la vía del AS y AJ ocurre a través de la proteína NPR1. La ruta de señalización del AS es dependiente de la enzima NPR1 (Non-expressor of PR1), que al ser silenciada se observa mayor expresión de LOX2, enzima clave de la vía octadecanoica para la síntesis de AJ (Derksen, Rampitschb, & Daayfa, 2013). Se ha observado también que el AS inhibe la síntesis de etileno a partir de ácido carboxílico-1-aminociclopropano en un cultivo de pera (Leslie & Romani, 1988).

Al analizar la expresión de genes PR también se han obtenido resultados que dan evidencia del antagonismo de estas rutas. El gen PDF1.2. es una defensina que se activa en la vía del AJ/Et, se

ha observado incrementos de esta en plantas insensibles/deficientes de AS en comparación a plantas tipo salvaje. Lo mismo ocurre con los inhibidores de proteinasa, los cuales también pertenecen a la vía del AJ/Et (Derksen et al., 2013).

Son numerosos los estudios que han reportado el antagonismo entre las vías del AS y AJ, mostrando que genes PR regulados positivamente por AS como PR1, PR2 y PR3 eran suprimidos en la presencia de AJ, y genes PR regulados positivamente por AJ como PR2, PR5 y PR6 eran suprimidos por AS (Gimenez-Ibanez & Solano, s. f.; Van der Does et al., 2013; Zander, Chen, Imkampe, Thurow, & Gatz, 2012).

1.4.4. Genes Relacionados con la Patogénesis (PR)

La expresión de genes PR forma parte de la respuesta inducida que se desencadena en plantas en respuesta al estrés de factores bióticos o abióticos. Originalmente se conocían cinco clases de genes PR (PR 1-5), las cuales fueron caracterizadas mediante técnicas bioquímicas y moleculares (Bol, Linthorst, & Cornelissen, 1990).

Actualmente los genes PR se encuentran categorizadas en 17 familias. Los criterios para la inclusión de nuevas familias fueron que las proteínas deben ser inducidas por patógenos en tejidos donde habitualmente no se hallan expresadas o que poseen una expresión muy baja, y que la inducción de su expresión debe haberse mostrando en al menos dos interacciones planta-patógeno, o en la misma interacción planta-patógeno pero en estudios diferentes (Van Loon & Van Strien, 1999).

Las proteínas PR incluyen β -1,3 glucanasas, quitinasas, proteínas tipo taumatina, peroxidasas, proteínas inactivadoras del ribosoma, defensinas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos, oxalato oxidasas, y proteínas tipo oxalato oxidasa (Ebrahim, Usha, & Singh, 2011).

De estas proteínas, las quitinasas y β -1,2 glucanasas son dos tipos de enzimas hidrolíticas abundantes en numerosas plantas tras la infección de diferentes tipos de patógenos. El incremento significativo de estas juega un rol principal en la defensa contra patógenos fúngicos al degradar su pared celular, ya que la quitina y el β -1,3 glucano son compuestos principales de esta (Ebrahim et al., 2011).

1.4.4.1. Proteínas PR de acción antifúngica

1.4.4.1.1. PR1

Las proteínas PR1 constituyen la familia más conservada en plantas, pertenecen a la superfamilia de proteínas CAP (*cysteine rich secretory protein (CRISP), antigen 5, and PR1 proteins*) y posee homólogos en hongos, insectos, y vertebrados (Schreiber, Karlo, & Kovalick, 1997).

A pesar de que esta familia se ha estudiado extensamente, su función permanece enigmática (Pecenková, Pleskot, & Žárský, 2017). Pero se ha sugerido que posee actividad antifúngica, o que cumple un rol en la defensa mediada por AS y la muerte celular programada que forma parte de la RH (Van Loon, Rep, & Pieterse, 2006).

Las proteínas PR1 son las más abundantemente producidas durante una infección en tabaco, alcanzando el 2% de proteínas totales en sus hojas. La mayor parte de los miembros de la familia PR1 se secretan y acumulan en el apoplasto, aunque también se ha detectado acumulación dentro de vacuolas de protoplastos (Sessa, 1995).

Su acumulación también ha sido asociada a la respuesta a estrés abiótico (Kothari, 2016), al crecimiento y desarrollo de la planta (Memelink, 1990), incluso en la fase de senescencia en hojas (Fraser, 2015), pero estos casos no han sido profundamente estudiados aún.

1.4.4.1.2. PRs tipo taumatina

El grupo de proteínas PR5 son de tipo taumatina, porque su estructura es semejante a este conocido edulcorante que se acumula en los frutos de la especie *Thaumatococcus daniellii* (Vigers, Wiedemann, Roberts, Legrand, & Selitrennikoff, 1992).

Las proteínas de tipo taumatina están relacionadas con la respuesta defensiva en plantas frente factores bióticos y abióticos (Petre, Major, Rouhier, & Duplessis, 2011). Se ha observado la acumulación de proteínas PR5 para la aclimatación al frío y como anticongelante en invierno en los apoplastos del tejido de centeno. Otras proteínas PR5 como las osmotinas se inducen como respuesta al estrés osmótico en tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Van Loon & Van Strien, 1999).

Como antifúngicos, las taumatinas tienen efectos que incluyen alteraciones de la integridad de la membrana celular, llevando a la inhibición del crecimiento fúngico, lisis de esporas, número de esporas reducido o reducción de la viabilidad de estas esporas (Tobias, Manoharan, Pritsch, & Dahleen, 2010) y degradación de la pared celular (Zareie, Melanson, & Murphy, 2002). Rout et. al (2016) aislaron y caracterizaron una proteína PR5 a partir de ajo (*Allium sativum*) luego de ser inducida con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*.

1.4.4.1.3. PRs tipo β -1,3-Glucanasas

El grupo de proteínas PR2 está conformado por proteínas tipo β -1,3-glucanasas. Esencialmente, las β -1,3-glucanasas intervienen en el crecimiento y desarrollo de la planta, pero también tienen un potencial defensivo actuando directamente sobre patógenos fúngicos como en el caso de las proteínas PR2 (Balasubramanian, Vashisht, Cletus, & Sakthivel, 2012).

Estudios en la uva roja de mesa (*Vitis vinífera* cv. Cardinal) relacionaron al gen *Vcgns1*, codificante de una β -glucanasa con el rol de crioprotectante en el fruto (Romero et al., 2008). También se ha observado que limita la formación de cristales en los apoplastos a bajas temperaturas (Yaish, Doxey, McConkey, & Griffith, 2006).

En la reproducción, las β -glucanasas intervienen en procesos de formación, maduración y liberación de microsporas en las anteras (Doxey, Yaish, Moffatt, Griffith, & McConkey, 2007), y más adelante, las β -glucanasas clase I ayudan a romper la dormancia de las semillas mediante hidrólisis de la pared celular en la testa y protrusión de la radícula hacia el exterior (Leubner-Metzger, 2003).

Las β -1,3-glucanasas trabajan en combinación con quitinasas (isozimas) para hidrolizar las paredes celulares de patógenos fúngicos, escindiendo enlaces 1,3 y 1,6- glucosídicos. La degradación de la pared celular de las hifas no sólo facilita la lisis celular sino que favorece la acción de otros componentes de la defensa (Mohammadi & Karr, 2002).

1.4.4.1.4. PRs tipo quitinasas

Los grupos 3, 4, 8 y 11 de genes relacionados con patógenos pertenecen a las quitinasas, un extenso y variado grupo de proteínas que mejora la defensa de la planta contra patógenos que contienen quitina, como los organismos fúngicos, que la contienen en su pared celular.

En base a su estructura tridimensional las quitinasas se clasifican en dos familias, denominadas 18 y 19 glicosil hidrolasas. La familia 18 tiene un dominio en forma de barril constituido por hojas beta y hélices- α , mientras que la familia 19 posee un pliegue común en su sitio activo y además poseen una hélice- α (Henrissat, 1999).

Paralelamente, las quitinasas se dividen de acuerdo a su secuencia N-terminal, localización de la enzima, pH isoelectrico y péptido señal en siete clases diferentes – I, II, III, IV, V, VI y VII. Las clases I, II y IV comprenden la familia 18 mientras que las clases III y V forman la familia 19 (Renner & Specht, 2012).

De acuerdo a su acción catalítica, las quitinasas se dividen en dos grupos mayores; las endoquitinasas, las cuales hidrolizan la quitina en un sitio interno y producen oligómeros de N-acetilglucosamina tales como diacetil-quitobiosas y quitotriosas, y las exoquitinasas, que se subclasifican en quitobiosidasas (que degradan las diacetil-quitobiosas) y en 1,4 α -glucosaminidasas (que escinden subproductos de las endoquitinasas y quitobiosidasas) (Sahai & Manocha, 1993).

En provecho de las propiedades de estas enzimas, se han empleado técnicas de transformación para expresar endoquitinasas provenientes de *Trichoderma harzanium* L1 en plantas como manzana (Bolar, Norelli, Hayes, Harman, & Aldwinckle, 2000), algodón (Emani et al., 2003),

brócoli (Mora & Earle, 2001), limón (Gentile et al., 2007) y arroz (Shah, Raghupathy, & Veluthambi, 2009) logrando resistencia a hongos fitopatógenos.

1.4.4.1.5. PRs tipo endoproteinasa

El grupo de proteínas PR7 actúan como endoproteinasas y han sido han sido caracterizadas en tomate (*Solanum lycopersicum*).

Las endoproteinasas son un subgrupo de enzimas proteolíticas dentro de las proteasas, y están estrechamente vinculadas a procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta. Actúan de dos maneras: la primera es la proteólisis limitada, en la que rompen uno o un limitado número de enlaces peptídicos para la activación o maduración de una proteína inactiva; la segunda forma es la proteólisis ilimitada, en la que degrada totalmente una proteína en sus aminoácidos constituyentes (Schaller, 2004).

Se sugiere que las proteínas PR7 intervienen en la lisis de la pared celular de organismos fúngicos como una herramienta defensiva accesoria (Van Loon & Van Strien, 1999).

1.4.4.1.6. PRs tipo inhibidores de proteinasas

El grupo de proteínas PR6 pertenece al grupo de inhibidores de proteinasas, las cuales son antagonistas naturales de las proteasas.

Las funciones principales de los inhibidores de proteasas son la defensa de la planta y regulación de las proteasas endógenas (Shewry, 2003). Usualmente estos inhibidores proteínicos poseen numerosos residuos de cisteína, los cuales forman puentes disulfuro, confiriendo a la planta resistencia frente condiciones adversas de temperatura, pH y proteólisis (Hung, Huang, Tsai, Wang, & Chen, 2003).

La mayoría de inhibidores de proteínasa interactúan con su proteasa diana al unirse al sitio activo de esta resultando en la formación de un complejo proteasa-inhibidor el cual es incapaz de realizar actividad enzimática (Rakashanda et al., 2013).

Los primeros estudios que indican que los inhibidores de proteínasa juegan un papel defensivo en las plantas consistían en alimentar insectos con dietas ricas en estos compuestos, lo cual redujo desarrollo de los mismos. Aparte, ensayos de inhibición *in vitro* aplicando inhibidores de proteínasas sobre proteasas de vísceras de insectos sustentaron más esta idea (Reeck et al., 1997).

Sin embargo, la evidencia más directa de la relación de los inhibidores de proteínasas en la respuesta defensiva viene de varios estudios en plantas transgénicas, como la transformación de plantas de tabaco con el gen *CpTI* de fréjol codificante de un inhibidor de proteasas que confiere resistencia al ataque de larvas de polilla (*Heliothis virescens*) (De Leo et al., 2002).

Los inhibidores de proteínasa también intervienen en la defensa natural de la planta contra infecciones fúngicas. La interacción proteínasa-inhibidor afecta a proteasas extra e intracelulares que desempeñan roles importantes en la nutrición y degradación de la pared celular del huésped como parte del proceso infectivo (Lopes et al., 2009).

Mediante ensayos de inhibición, la inhibidora de tripsina purificada proveniente de *Pseudostellaria heterophylla* mostró actividad antifúngica hacia *Fusarium oxysporum* (J. Wang & Ng, 2006). En otro estudio, un inhibidor de tripsina purificado de semillas de *Clausena lansium* mostró actividad antifúngica contra *Physalospora piricola*, pero no afectó el crecimiento de *Mycosphaerella arachidicola*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* o *Coprinus comatus* (Ng,

Lam, & Fong, 2003). Es decir, que la complejidad de los inhibidores de proteínasa para afectar a patógenos fúngicos varía.

1.4.4.1.7. PRs tipo tionina y defensina

El grupo 12 de proteínas relacionadas con patógenos es de tipo defensina mientras que el grupo 13 pertenece a las tioninas. En general, comprenden moléculas antimicrobianas de baja masa molecular (5 kDa) ricas en cisteína con actividad defensiva única.

Las defensinas son la familia más grande de moléculas peptídicas antifúngicas y formados por 45 a 54 aminoácidos (Zasloff, 2002). Su acción antifúngica consiste en la formación de poros en la membrana celular causando su disrupción y conduciendo a la muerte del patógeno (Thevissen, Kristensen, Thomma, Cammue, & Francois, 2007).

Por su parte, las tioninas poseen de 45 a 48 aminoácidos y conforman el grupo de polipéptidos antimicrobianos de rápida formación que actúan directamente sobre la permeabilidad de la membrana de los hongos patógenos (Stec, 2006). Sin embargo, su mecanismo de acción definitivo sigue siendo debatido.

La tionina *THI2.1* de *Arabidopsis thaliana* forma parte de la respuesta defensiva de la ruta del ácido jasmónico. Su expresión es consistente en mutantes *cev1* (*constutive expression of vegetative storage protein*) los cuales producen AJ y etileno constitutivamente (Ellis & Turner, 2001). En experimentos en el ecotipo *Col-2* de *A. thaliana*, el cual es susceptible a *F. oxysporum*, la sobreexpresión de la tionina *THI2.1* redujo la invasión de dicho hongo en los cotiledones así como la deformación de sus hifas (Epple, Apel, & Bohlmann, 1997).

Cabe mencionar que las propiedades antifúngicas mencionadas no son generales. Se ha observado actividad antifúngica diferencial entre proteínas estructuralmente relacionadas, como en el caso de la defensina *MsDef1* proveniente de alfalfa (*Medicago sativa*) que posee 65% de inhibición sobre *Fusarium gramineum* y *MtDef2* proveniente de *Mendicago truncata* la cual carece de actividad antifúngica (Spelbrink et al., 2004).

1.4.4.1.8. PRs de transferencia de lípidos

Las proteínas de transferencia de lípidos (PTL) son pequeñas moléculas (9-10 kDa) que representan el 4% de proteínas solubles en abundancia y se ubican en la pared celular. Las PTL participan de la transferencia *in vitro* de fosfolípidos entre membranas y se unen a grupos acilo. Estas propiedades permiten deducir su importancia para procesos de biogénesis de membranas celulares y regulación de ácidos grasos intracelulares (Sossountzov et al., 1991).

La expresión en trigo del gen *Ace-AMPI*, codificante de un PTL de cebolla (*Allium cepa*) mostró mejoras en la respuesta defensiva y actividad antifúngica contra *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, un hongo fitopatógeno biotrófico (Roy-Barman, Sautter, & Chattoo, 2006). El mecanismo antifúngico de estas proteínas aún no está definido, pero se sugiere que estas se insertan en la membrana celular del patógeno con su central hidrofóbica a manera de poro permitiendo la fuga de iones y conduciendo a la muerte celular (Selitrennikoff, 2001).

1.4.5. Cuantificación de la severidad de enfermedades foliares

1.4.5.1. Clave de Evaluación de la Enfermedad (Disease assessment key)

Este método califica los síntomas visibles de la enfermedad utilizando una escala que corresponde a la intensidad de los mismos, designando 1 cuando el síntoma cubre 0-1 % y 8 cuando

cubre 75-100 % de la superficie foliar. Este método permite cuantificar síntomas visibles pero introduce cierto valor de subjetividad del observador (Thompson & Jenkins, 1985).

Una forma de reducir la subjetividad es el uso de análisis digital para cuantificar la severidad de la enfermedad sobre la base de los cambios de color de la hoja a causa de los síntomas, tal como lo describió Wijekoon et al. (2008).

1.4.5.1. Fluorimetría de Clorofila

Es una herramienta ampliamente aplicada en estudios de ecofisiología. El principio de esta técnica es la absorción de luz por la clorofila del fotosistema II (FSII). Esta luz tiene tres destinos: una porción se emplea para la fotosíntesis (*photochemical quenching*), otra parte se transforma en calor (*Non photochemical quenching*) y lo restante se vuelve a emitir como fluorescencia (Duyens, 1963).

El objetivo de la fluorimetría de clorofila es medir ciertos parámetros que permiten interpretar la fluorescencia reemitida por las hojas (Baker, 2008). Estos datos pueden ser tomados en tejidos adaptados a oscuridad, de manera que la cadena de transporte electrónico tilacoidal no está activa y por lo tanto está completamente oxidada, o en estado ‘abierto’. De este modo se obtiene una estimación de la máxima eficiencia potencial de fotosíntesis (Tung, Goodwin, & Hsiang, 2013).

Ciertos parámetros también pueden ser medidos en hojas adaptadas a luz (exposición a luz fotosintéticamente activa, o actínica), de manera que la cadena de transporte electrónico tilacoidal está activa y no en estado ‘abierto’, permitiendo evaluar la eficiencia a la que normalmente trabaja la planta (Tung et al., 2013).

Algunos de los parámetros son de esta fluorimetría son:

F_o, el cual indica la fluorescencia mínima en condiciones de oscuridad y se mide mediante un haz de luz débil en ausencia de luz actínica o pulsos saturantes; F_s' y F_s, que es la fluorescencia luego de la inducción con un haz de luz actínica no saturante en tejido adaptado a la luz y oscuridad respectivamente; F_m' y F_m, que determinan la fluorescencia máxima en hojas mediante varios pulsos de luz saturante que sobrecarga el transporte de electrones entre FSI y FSII en condiciones de luz y oscuridad respectivamente (Duyens, 1963).

Cuando una planta adaptada a oscuridad es expuesta a luz actínica, la intensidad de la fluorescencia se incrementa en milisegundos, pero después de pocos segundos la intensidad decrece y luego se estabiliza. Este fenómeno se denomina efecto Kautsky. Este incremento inicial de la fluorescencia se atribuye a la progresiva saturación del FSII, que luego decrece y se estabiliza con el incremento de la actividad fotosintética (*photochemical quenching*) y disipación de calor (*non-photochemical quenching*) (Kautsky & Hirsch, 1931).

Otros parámetros de utilidad empleados por Bjorkman y Demmig (1987), que derivan de los anteriores son:

$F_v = F_m - F_o$, que indica la capacidad del FSII para realizar procesos fotoquímicos y F_v/F_m , que es la eficiencia máxima del FSII para usar la luz en procesos fotosintéticos. Al tomar valores de F_v/F_m en hojas adaptadas a oscuridad se puede observar la eficiencia cuántica potencial de FSII, el cual constituye indicador sensible del desempeño fotosintético de la planta, con valores óptimos rodeando 0,83 en la mayoría de plantas (Bjorkman & Demmig, 1987).

Mediante la cuantificación de la fluorescencia de la clorofila se puede determinar el desempeño fotosintético en la hoja y el calor disipado (Maxwell & Johnson, 2000). Las ventajas de este método

son su alta sensibilidad, inocuidad para el tejido y carencia de subjetividad (Mahlein, Oerke, & Steiner, 2012).

1.4.6. Técnicas Moleculares

1.4.6.1. Extracción de ARN

El ARN es el tipo de molécula biológica que juega un papel crítico en la transferencia de la información codificada en el genoma para dar lugar a la formación de proteínas. La extracción de ARN de los tejidos permite la separación de estas moléculas del resto de constituyentes celulares, lo cual representa un reto cuando la finalidad es obtener un ARN puro y en suficiente cantidad (Yockteng et al., 2013).

El ARN es inestable y más delicado que el ADN al manipularse. Esto se debe a que generalmente se presenta en cadena simple, y posee grupos 2'-hidroxilo unidos a su ribosa, lo que lo hace más propenso a hidrólisis. Existen numerosos métodos de extracción de ARN, cuya elección depende del tipo de tejido (MacRae, 2007).

La extracción con fenol-cloroformo es un método de extracción líquido-líquido en la que se separan distintas moléculas de una mezcla en dependencia de sus distintas solubilidades en distintos líquidos no miscibles (Stenesh, 1989). Esta técnica ha sido aplicada en variedad de muestras incluyendo bacterias, sangre, tejido vegetal, virus, y levaduras.

El primer paso es homogenizar las células con métodos que dependen del tipo de muestra de que se disponga. Después se realiza la extracción al mezclar fenol-cloroformo con el tejido lisado, y por centrifugación, se obtiene a una fase orgánica inferior y una fase acuosa superior. Los ácidos

nucleicos son de naturaleza polar, por lo que el ARN se solubiliza en la fase acuosa superior (Zumbo, 2006).

El siguiente paso es la precipitación de ARN, la cual se realiza con isopropanol puro; que tiene poca solubilidad con el ARN, luego se realiza el lavado con etanol para retirar los residuos de los solventes orgánicos empleados y finalmente se solubiliza el ARN en agua. Todo el proceso ha de realizarse con un mínimo de RNAsas. Así, se utiliza agua libre de RNAsas, usualmente agua tratada con DEPC (Di-etil piro-carbonatada) (Chomczynski & Sacchi, 2006).

Sin embargo, esta y otras técnicas pueden variar de acuerdo a la composición de la muestra, lo cual exige una optimización para estandarizar los protocolos concretos.

1.4.6.2. Transcripción Reversa

Se denomina transcripción reversa a la síntesis de ADN a partir de ARN, lo cual da como producto ADN complementario (ADNc). La enzima que lo realiza, llamada transcriptasa reversa usa el ARN como molde y un cebador corto complementario aguas abajo del ARN. El ADNc obtenido puede emplearse directamente como molde para PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (New England BioLabs, 2018).

Las enzimas comerciales para este proceso son extraídas de retrovirus que utilizan este recurso, como el virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV) o el virus de mieloblastosis aviar (MLV), y son modificadas para convertir de forma eficiente y total el ARN, tratando de complementar el ARN hasta el extremo 5'. Además, la termoestabilidad de estas enzimas permite efectuar la reacción a altas temperaturas, mejorando la conversión de ARNs que presentan estructuras secundarias (New England BioLabs, 2018).

1.4.6.3. PCR Convencional

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica que permite clonar fragmentos de ADN. Para lo cual se requiere una fuente de ADN, y suficiente información sobre ella para el diseño de cebadores específicos dirigidos al amplicón (fragmento a amplificar) deseado (New England BioLabs, 2018).

Durante una PCR típica, el molde de ADN se mezcla con desoxirribonucleótidos (dNTPs), la enzima polimerasa y los cebadores. Los cebadores son secuencias cortas de nucleótidos complementarios al molde de ADN, y sirven como sitio de reclutamiento de la polimeasa. Luego, tras una serie de ciclos de temperatura con específicos lapsos de tiempo, se logra la amplificación (New England BioLabs, 2018).

La enzima más comúnmente utilizada para la amplificación es *taq polimerasa*, proveniente de *Thermus aquaticus*, la cual deja segmentos terminales de adenina sobresalientes en el extremo 3' del amplicón. Sin embargo, se considera que esta enzima posee razonable fidelidad (ThermoFisher Scientific, 2018).

1.4.6. Genes de expresión constitutiva (housekeeping genes)

Los genes *housekeeping* se caracterizan por producir transcritos expresados de forma estable por lo que pueden constituir referencias internas cruciales para la normalización de los datos sobre expresión de genes (Czechowski, Bari, Stitt, Scheible, & Udvardi, 2004).

Algunos de los genes de referencia más conocidos y más frecuentemente utilizados para datos de PCR cuantitativa o semicuantitativa tanto en plantas como animales son ARNr 18S, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación-

1 α , poliubiquitina, actina, y α -tubulina y β -tubulina. Estos genes fueron escogidos para que los niveles de sus transcritos fuesen referencias analíticas en la era pre-genómica por su conocido o supuesto rol *housekeeping* en procesos básicos, tales como el mantenimiento del metabolismo celular primario (Brunner, Yakovlev, & Strauss, 2004).

1.4.6.1. NADH deshidrogenasa 5

NADH deshidrogenasa 5 es una proteína codificada por el gen *MT-ND5*, y forma parte de una un complejo enzimático mayor llamado Complejo I, que está activo en la mitocondria (Genetics Home Reference, 2006).

El Complejo I es uno de los varios complejos enzimáticos necesarios para la fosforilación oxidativa. Dentro de la mitocondria, estos complejos están ubicados en una membrana especializada y estrechamente doblada llamada membrana mitocondrial interna. Durante la fosforilación oxidativa, estos complejos enzimáticos mitocondriales llevan a cabo reacciones químicas para la producción de ATP. Es decir, crean un desbalance en la carga eléctrica en cualquiera de los lados de la membrana mitocondrial interna a través de la transferencia de electrones, dicha diferencia de carga otorga la energía necesaria para la producción de ATP (Genetics Home Reference, 2006).

El rol del Complejo I es el primer paso de la fosforilación oxidativa, que implica el transporte de electrones desde la molécula del NADH hacia la ubiquinona. Luego, los electrones pasan desde la ubiquinona al resto de complejos enzimáticos para la generación de ATP (Genetics Home Reference, 2006).

1.4.7. Hipótesis

La especie *Vasconcellea stipulata* responde a la infección con *Fusarium oxysporum* levantando una de las dos principales vías de señalización inducidas por hormonas (ácido salicílico o ácido jasmónico) y el gen PR correspondientes a la misma.

CAPÍTULO II: METODOLOGIA

2.1. Participantes

El presente proyecto de titulación contó con el financiamiento de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE por formar parte del proyecto número 2015-PIC-022 “Selección de protoplastos de *Vasconcellas* resistentes a *Fusarium* mediante técnicas citológicas y moleculares”.

La alumna responsable del desarrollo de este proyecto de titulación es la señorita Mayra Johana Heredia Guzmán, egresada de la carrera de Ingeniería en Biotecnología. Los profesionales colaboradores y asesores del trabajo fueron; Carlos Noceda, PhD, en calidad de Director del proyecto de titulación; Karina Proaño, PhD, jefa del laboratorio de Biotecnología Vegetal; Ligia Ayala, PhD, docente investigadora, y Christian Peña, MSc, docente; todos pertenecientes a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

2.2. Zona de Estudio

El presente proyecto de titulación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal ubicado en la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE, Matriz Sede Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

2.3. Duración de la Investigación

El presente proyecto tuvo una duración de 18 meses aproximadamente. Desde su planteamiento en marzo del 2017 hasta su presentación en septiembre del 2018.

2.4. Metodología

Inicialmente se estableció un sistema de infección en hoja desprendida en cámara húmeda, para determinar un método de infección efectivo y verificar que los controles (no infectados) no sean deteriorados por el procedimiento.

Luego se desarrollaron dos experimentos, el primero fue un análisis molecular para evaluar la expresión de genes PR y el gen GSNOR en hojas infectadas con *Fusarium oxysporum* (*Fox*). Mientras que el segundo experimento consistió en el asperjado de varias hormonas vegetales previo a la infección con *Fox*, para evaluar la severidad de la enfermedad con cada hormona.

En ambos ensayos se elaboraron sistemas de infección en hoja desprendida en cámara húmeda para ser utilizadas como unidades experimentales (UE) y medir las variables de respuesta en cada una. Los resultados fueron posteriormente analizados mediante herramientas de estadística inferencial.

2.5. Material Vegetal

Los ensayos se realizaron en hojas desprendidas de babaco y jigacho adultos de unos siete años de edad, cultivados en invernadero en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas 'ESPE', en su extensión IASA I Hacienda el Prado Selva Alegre, Sangolquí.

2.6. Aislamiento del hongo y preparación de la Solución de Esporas

Se realizó el aislamiento de *Fusarium oxysporum* a partir de tejido infectado de babaco con síntomas característicos de marchitez vascular, como caída de hojas, pudrición de la raíz y haces vasculares de color café negruzco. Se tomó un trozo de tallo con los síntomas descritos cuando

estos aún no habían progresado en toda la planta. Se desinfectó superficialmente con hipoclorito de sodio y agua estéril, para después depositarlo en una cámara húmeda durante 4 días.

Al brotar el hongo formando hifas en la superficie del tallo se realizó el aislamiento. Para ello se tomó con una aguja estéril una sección de las hifas superficiales que luego se colocaron en medio PDA (Agar Papa Dextrosa). Para la multiplicación del hongo se colocaron las cajas de siembra al ambiente en un lugar desprovisto de luz.

Cuando el hongo colonizó toda la caja se indujo su esporulación con la incidencia directa de luz. Se asume que en este paso aconteció la generación y liberación de esporas. Para obtener las esporas en solución se colocaron entre 4 y 5 mL de solución salina (NaCl 0,9%) en la caja con el crecimiento micelial y se realizó un raspado de la superficie del medio de cultivo. Seguidamente se filtró el líquido de la caja a través de varias capas de gasa estéril en un tubo Falcon® de 25 mL estéril. El conteo de esporas se realizó con la ayuda de una cámara Neubauer y se llevó la solución obtenida a una concentración de 10^6 esporas/mL.

2.7. Establecimiento de un sistema de infección en cámara húmeda

2.7.1. Sistema de Infección en hoja desprendida

Los ensayos se realizaron en hojas desprendidas de jigacho y babaco que fueron conservadas en cámaras húmedas. Las cámaras húmedas se guardaron en un ambiente cerrado bajo luz blanca constante.

Para el ensamble de dichas cámaras húmedas se utilizaron tarrinas plásticas transparentes desinfectadas con alcohol al 70%, en cuya base se colocó una cama de papel absorbente humedecido con agua estéril. Las hojas se nutrieron dentro de la cámara con solución Hoagland

contenida en un trozo de algodón colocado en el extremo inferior del peciolo y envuelto en papel Parafilm® para mantenerse acoplado. Se indujo estrés en las hojas privándolas de luz por 24 h, con el fin de volverlas más susceptibles a enfermar.

Para proceder con la infección se preparó una solución de esporas de *Fox* con una concentración de 10^6 esporas/mL. Se infectaron las hojas mediante tres métodos de infección, de los cuales se escogería el más eficiente. El primer método consistió en la aplicación superficial de la solución de esporas (Método A), el segundo método consistió en realizar pequeñas heridas por punción con una aguja en el limbo de la hoja y la subsiguiente aplicación superficial de la solución de esporas (Método B), y el tercer método consistió en la aplicación directa de esporas en la solución nutritiva acoplada al peciolo (Método C).

Se elaboraron dos tipos de controles: un control con aspersión superficial de solución salina únicamente (Ctrl 1), y otro con punción y aspersión superficial de solución salina (Ctrl 2). Cada tratamiento y cada control tuvieron tres réplicas.

Se evaluó el fenotipo de la enfermedad desde el día 1 hasta el 11 posteriores a la infección, en cada observación se asignó un índice de severidad de la enfermedad (IS), basado en una escala de valores de 0 a 5 de acuerdo a la expansión de los síntomas de amarillamiento y/o necrosis sobre la superficie de la hoja como se indica en la Tabla 1 (Thompson & Jenkins, 1985).

Tabla 1:

Índice de severidad y significado de cada valor

Valor	Significado
0	Ausencia de síntomas
1	Amarillamiento/necrosis cubriendo 1-25% de la superficie de la hoja
2	Amarillamiento/necrosis cubriendo 26-50% de la superficie de la hoja

Continua...

Continúa...

3	Amarillamiento/necrosis cubriendo 51-75% de la superficie de la hoja
4	Amarillamiento/necrosis cubriendo 76-100% de la superficie de la hoja
5	Muerte total de la hoja

Fuente: (Thompson & Jenkins, 1985)

2.7.2. Análisis estadístico de datos

Con el fin de determinar el método más eficiente de infección con *Fox* en hojas en cámara húmeda, se definieron tres grupos con distintas formas de inoculación del hongo (A, B y C) y dos grupos control (Ctrl 1 y Ctrl 2). Los métodos de inoculación consistieron en:

A: Aplicación de una solución de esporas del hongo por aspersión superficial sin punción.

B: Aspersión superficial de esporas del hongo en solución con lesiones por punción.

C: Adición de esporas en la solución nutritiva para su absorción por el peciolo.

Por su parte, los grupos control fueron, hojas con aspersión superficial de solución salina sin esporas del hongo para el primer control (Ctrl 1) y hojas con lesiones causadas por punción seguido del asperjado con solución salina sin esporas para el segundo control (Ctrl 2). Cada grupo se diseñó por triplicado.

Los datos fueron medidos a juicio del observador en base a la severidad de la enfermedad sobre las hojas a lo largo de 11 días y se empleó una escala de severidad con valores enteros de 0 a 5, los cuales constituyen una variable de respuesta no paramétrica (Tabla 2).

Tabla 2:

Variables del establecimiento del sistema de infección

Variable dependiente	Índice de Severidad
Variable independiente	Tiempo

Ya que la variable de respuesta está medida en valores de una escala ordinal se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar el tratamiento más afectado por el hongo en cada uno de los días posteriores a la infección que fueron evaluados.

La hipótesis a prueba quedó de la siguiente manera: Al menos una de las medianas del índice de severidad de cada método de infección es diferente en cada día posterior a la infección.

En los casos donde se encontró diferencias significativas se utilizó la comparación de a pares con un nivel de significancia del 5%. El método de infección seleccionado como el más efectivo, corresponde al que presentó diferencias significativas más tempranamente; es decir, que indujo aumento del índice de severidad de la enfermedad en un corto periodo de tiempo.

2.8. Experimento 1: Ensayo de Expresión de Genes PR en hojas desprendidas de Jigacho infectadas con *Fox*

2.8.1. Sistema de infección en hoja desprendida

Se infectaron hojas de jigacho en las cámaras húmedas. Este proceso consistió en realizar una serie de lesiones sobre el limbo de todas las hojas con una aguja estéril, las cuales estén homogéneamente distribuidas en la superficie, con el fin de procurar que la respuesta fisiológica también sea homogénea. Luego se asperjó una dilución de esporas (10^6 esporas/mL) sobre cada una de las hojas, se dejaron reposar y se recogieron en tubos falcon de 50 mL luego de tres periodos de tiempo (18, 24 y 30 h), las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta la extracción de ARN. Se recogieron las muestras infectadas y las muestras no infectadas simultáneamente tras cada periodo de tiempo.

2.8.2. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total de hojas de jigacho se empleó el mini kit de columnas *GeneJET Plant RNA Purification*® (Thermo Scientific) y el método fenol-cloroformo con Trizol® (Invitrogen).

Para la disrupción mecánica de tejido vegetal se colocaron las hojas en un mortero de porcelana frío, sobre el cual se colocó en él nitrógeno líquido y se trituró con ayuda del pistilo de porcelana. Se recogió el tejido triturado de cada muestra en un tubo Falcon® estéril para cada muestra respectivamente.

2.8.2.1. Método de extracción por columnas con el kit *GeneJET Plant RNA Purification*®

Se tomaron entre 100 y 150 mg del tejido triturado en un microtubo Eppendorf® de 1,5 mL, se le agregó 500 µL de *Plant RNA Lysis Solution*, y se procedió a mezclar vigorosamente con vórtex durante 15 s. Se incubó el tubo por 3 min a 56°C y se centrifugó por 5 min a 14000 rpm. Se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo, se agregaron 250 µL de etanol al 96%, y se homogenizó con micropipeta. Se transfirió la mezcla a una columna de purificación insertada en un tubo colector y se centrifugó por 1 min a 11000 rpm, para luego descartar el sobrenadante. Se volvió a montar la columna con el tubo colector, y se procedió a agregar 700 µL de *Wash Buffer 1* (WB1) a la columna de purificación. Se centrifugó por 1 min a 11000 rpm y se descartaron el sobrenadante y tubo colector. Se colocó la columna de purificación en un nuevo tubo colector de 2 mL.

Se agregaron 500 µL de *Wash Buffer 2* (WB2) a la columna de purificación y se centrifugó por 1 min a 11000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se montó el tubo colector en la columna nuevamente. Se repitió el lavado con WB2 y se volvió a centrifugar a 14000 rpm. Se descartó el tubo colector conteniendo el sobrenadante y se transfirió la columna de purificación a un tubo

Eppendorf® de 1,5 mL. Para resuspender el ARN se agregaron 50 µL de agua libre de nucleasas al centro de la membrana de la columna y posteriormente se centrifugó a 11000 rpm por 1 min.

Finalmente, se descartó la columna de purificación y se almacenó el ARN a -80°C hasta realizar la conversión en ADNc.

2.8.2.2. Método de extracción fenol-cloroformo con Trizol®

Partiendo del material vegetal triturado, se pesaron en la balanza entre 100 y 150 mg de material vegetal en un microtubo de 1,5 mL cónico (congelado en nitrógeno líquido), poniendo previamente en cero la balanza con el tubo sobre ella. Se tapó el tubo y se lo volvió a colocar en nitrógeno líquido.

Se agregaron 0,5 mL de *Trizol*, y se homogenizó brevemente con ayuda de un pistilo de polietileno. Se agregaron los 0,5 mL restantes de *Trizol* (se coloca 1 mL de TRIZol para cada 100 mg de muestra en total), se agitó la mezcla en un rotor y se incubó por 5 min en hielo.

Se agregaron 250 µL de cloroformo (1 mL *Trizol*: 0,2 mL cloroformo), se agitó vigorosamente el tubo por 15 s en un vórtex, y se incubó por 10 min en hielo.

Se centrifugó el tubo a 16000 rpm por 20 min a 4°C, y luego se separó el sobrenadante (~650 µL) a un nuevo microtubo con ayuda de una micropipeta. Se adicionaron 500 µL de isopropanol frío (0,5 mL isopropanol: 1 mL TRIZol) para luego incubarse a -20°C por 30 min.

Se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, previniendo pérdida del pellet y se adicionó 1 mL de etanol al 75% (o 70%). Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4°C, se repitió el lavado con etanol y se dejó secar.

Finalmente se resuspendió en 30 μ L de agua DEPC (Diethyl pirocarbonato) y se almacenó a -80°C hasta su posterior uso.

2.8.3. Cuantificación y análisis de calidad de ARN

Para determinar la concentración de ARN total se utilizó el método de espectrofotometría mediante el equipo *Nanodrop Spectrophotometer 2000c*. La integridad del ARN se verificó a través de electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) con *SYBR Safe- DNA Gel Stain* (0.05 μ L/ μ L) y TBE. Para la corrida se cargó 4 μ L de muestra de ARN con 2 μ L de buffer de carga *Blue Juice 10X* (Invitrogen®) en cada pocillo y se utilizó una fuente de poder a 100V y 300 mA durante 40 min. Al finalizar el resultado se visualizó en un transiluminador de luz UV y se tomó una foto para su posterior análisis.

2.8.3.1. Cálculo de los ratios 260/280 en ARN total

Para determinar el ratio 260/280 de una muestra de ARN en gel de agarosa se utiliza el editor de imágenes ImageJ®. Para ello, se procedió a medir las densidades de tres áreas dentro del mismo carril de corrida: la primera corresponde al área de la banda 28s, la segunda corresponde a la banda 18s y la tercera corresponde al fondo, el cual viene a ser la fluorescencia de ruido (Figura 4).

Después de tomar los datos de las fluorescencias, se debe normalizar las densidades de las bandas 28s y 18s, dividiéndolas para la densidad de fondo. Finalmente, se divide los valores de las densidades 28s y 18s obtenidas.

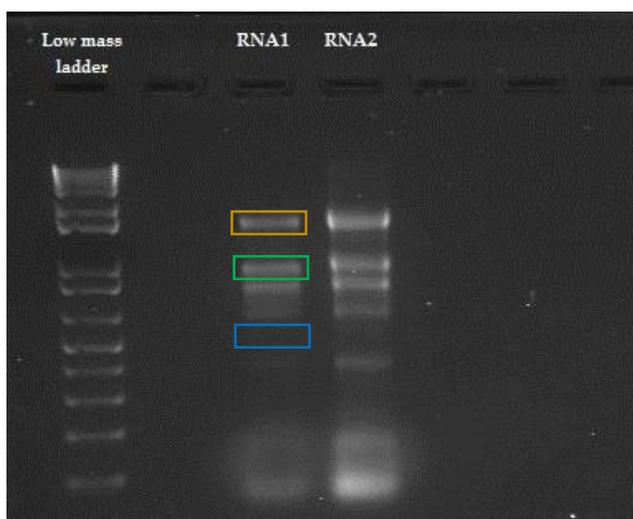


Figura 4: Áreas para el determinar el ratio 260/280 a partir de sus densidades absolutas.

Nota: el borde amarillo encierra el área de la banda 28s, el borde verde encierra la banda 18s y el borde azul encierra un área de referencia que corresponde al ruido de fondo.

2.8.4. Síntesis de ADNc

Se sometió el ARN a un pretratamiento con *DNase I* (Invitrogen®), para lo cual se colocó en un tubo de 0,2 mL el volumen de ARN equivalente a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (para una reacción de 10 μL), 1 μL de *10X DNase I Reaction Buffer* (Invitrogen®), 1 μL de *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen®) y agua DEPC hasta completar 10 μL . Las muestras se mezclaron e incubaron por 15 min a temperatura ambiente para que la enzima actúe. Luego, se detuvo la reacción con 1 μL de EDTA 25 mM (pH 8.0). Posteriormente, se inactivó la enzima *DNasa I* incubando a 65°C por 10 min en termociclador. Finalmente se obtuvo un volumen final de 11 μL conteniendo 1 μg de ARN tratado con DNAsa.

Para la síntesis de ADNc a partir del ARN tratado con *ADNasa I* se añadió agua DEPC para alcanzar un volumen de 12 μL . A continuación, se adicionó 1 μL de *Oligo dT Primer* (Invitrogen®)

y 1 μL de dNTPs (Invitrogen®) a una concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 10 mM respectivamente. Se procedió a incubar la reacción en el termociclador a 65°C por 5 min con el fin de facilitar la hibridación del *Oligo dT* con la cola poli(A) del ARN mensajero y una vez transcurrido el tiempo, las muestras se colocaron en hielo por 1 min. Se añadió 4 μL de *First Strand Buffer* (Invitrogen®), 1 μL de DTT (Invitrogen®) y 1 μL de *Superscript III Reverse transcriptase* (Invitrogen®), con concentraciones de 5X, 0,1 M y 200 U/ μL respectivamente. Finalmente, se incubó en el termociclador a 50°C por 60 min, a 55°C por 15 min y a 70°C por 15 min. El ADNc obtenido se conservó a -20°C.

2.8.5. Amplificación de genes PR y *housekeeping* por PCR convencional

2.8.5.1. Diseño de cebadores

Se diseñaron tres pares de cebadores en total, dos correspondientes a los genes PR (PR13 y PR2) y uno para el gen GSNOR. El diseño de cebadores para los genes PR y GSNOR se realizó mediante la herramienta bioinformática *Primer3*® y su análisis se realizó en *OligoAnalyzer*® y *PrimerBlast*®. Los criterios tomados en cuenta para el diseño se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3:

Parámetros seleccionados para el diseño de cebadores para PCR.

Parámetro	Rangos indicados	Valores óptimos
Longitud	18-27	20
Temperatura de Melting	60 \pm 2°C	60°C
Concentración %GC	45-55%	50%
Max Auto- complementariedad	0-6	3
Max Auto- complementariedad 3'	0	0
Max Poli-X	0-3	3
GC-Clamp	1-3	1

Fuente: (PremierBiosoft, 2018)

Luego del diseño, se procedió al análisis de los cebadores mediante el programa *OligoAnalyzer* 3.1.® donde se verificaron las energías de Gibbs para la formación de homodímeros, heterodímeros y bucles (*hairpin*). En PrimerBlast® se verificó la especificidad de estos.

2.8.5.2. Amplificación de ADNc

La amplificación se realizó mediante PCR convencional, para lo cual se utilizó el ADNc obtenido a partir del ARN de hojas de jigacho como molde.

La estandarización de esta técnica consistió en definir los parámetros de temperatura de *annealing* (T_a) y número de ciclos óptimos para la amplificación.

Se omitió la estandarización de las cantidades del cofactor $MgCl_2$, cantidad de enzima polimerasa y cantidad de dNTPs ya que la PCR se realizó con *DreamTaq Green PCR Master Mix* 2X®, que contiene todos estos elementos en cantidades predeterminadas. Las cantidades de cada reactante requeridas para una reacción de PCR se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4:

Composición de una reacción de PCR utilizando DreamTaq Green PCR Master Mix (2X).

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final	Volumen de adición
<i>DreamTaq Green PCR Mix</i>	2X	1X	10 μ L
Cebador- <i>Forward</i>	10 μ M	0,5 μ M	1 μ L
Cebador- <i>Reverse</i>	10 μ M	0,5 μ M	1 μ L
ADNc	5 ng/ μ L	5 ng	1 μ L
Agua DEPC	-	-	7 μ L
		Volumen Final:	20 μ L

Para determinar la temperatura de hibridación óptima de cada par de cebadores se realizaron PCRs en un gradiente de 14°C en función a la temperatura de hibridación teórica (T_a). La programación del termociclador para la PCR gradiente se detalla en la Tabla 5.

Los productos amplificados se corrieron en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* a 100 V y 300 mA durante 50 min. Una vez terminada la corrida, se realizó capturas de la imagen de fluorescencia en el foto-documentador *ChemiDoc®* (Bio-Rad).

Tabla 5:

Programación del termociclador para realizar PCR gradiente.

N.	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de Ciclos
1	Desnaturalización inicial	95	3 min	1
2 ^a	Desnaturalización	95	30 s	
2b	Hibridación	(Ta) ± 7	30 s	35
2c	Extensión	72	1 min	
3	Extensión Final	72	5 min	1

Con el fin de determinar el número de ciclos que debe aplicarse para la obtención de productos en la fase exponencial de la curva de la PCR se realizaron múltiples PCR variando el número de ciclos desde 18 hasta 45 ciclos. Se aplicaron los parámetros térmicos y químicos anteriormente seleccionados.

Adicionalmente, las subsiguientes PCRs se realizaron en presencia de cuatro tipos de controles: el primero es el control sin retrotranscripción (NRTC), el cual se realiza con el ARN luego del tratamiento con DNAsas para verificar que dicho tratamiento ha sido eficiente, es decir que no debe presentar productos de amplificación; el segundo es el *plateau* control (PTC), el cual se obtiene amplificando el gen analizado con la concentración de ADNc estándar a 45 ciclos, que es cuando el proceso de PCR ha alcanzado la fase tardía o *plateau*, este control permite verificar que las bandas de los resultados semicuantitativos se encuentran en la fase logarítmica; el control positivo (C+) es el resultado de amplificar una mezcla de todos los ADNc de las muestras extraídas; y el blanco (B) es la adición de agua en lugar de una muestra de material nucleico.

2.8.5.3. Análisis densitométrico de los resultados de PCR

El software para análisis densitométricos de geles ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*) se adquirió de forma libre en la página oficial ImageJ®.

Se abrió la imagen a analizar y se utilizó la herramienta *rectángulo* para encerrar la banda a analizar. Para medir su densidad integrada se utilizó *measure*; el valor fue registrado en una tabla del mismo programa. La densidad integrada de todas las bandas presentes en el gel se midieron con un rectángulo de la misma área, se midió además una sección superior y una inferior a la banda para calcular la densidad de ruido media (Figura 5), la cual se sustrajo del valor de densidad integrada obtenida de la banda.

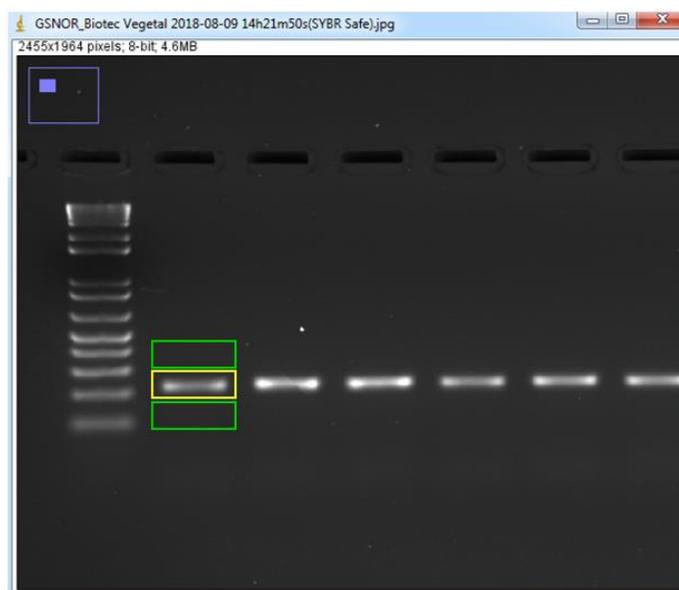


Figura 5: Análisis de densidad de bandas en ImageJ.

Nota: El rectángulo amarillo encierra el área de interés que contiene la banda. Los rectángulos verdes encierran las áreas que se utilizan para calcular la densidad de ruido.

2.8.6. Análisis estadístico de datos

Este experimento consistió en el análisis de transcritos de genes de la vía del AS, AJ, AJ/Et y NO en jigacho, a las 18, 24 y 30 horas posteriores a la infección de este con *Fox*.

Siguiendo un diseño completamente al azar de dos factores, se obtuvieron los datos de 24 UE distribuidas en dos grupos: tratamientos con hongo y controles sin hongo. Los tratamientos inoculados con hongo y sus respectivos controles se recogieron y congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en los periodos de tiempo post-infección a seleccionados como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6:

Tratamientos para el análisis de transcritos de genes de defensa en hojas de jigacho infectadas con Fox.

Tratamiento	Infección	Periodo post-infección (horas)	Réplicas
T18	Aplicación de solución de esporas del hongo	18	3
T24	Aplicación de solución de esporas del hongo	24	3
T30	Aplicación de solución de esporas del hongo	30	3
0h	Control	0	3
C18	Control	18	3
C24	Control	24	3
C30	Control	30	3

La variable de respuesta está expresada como densidad de banda del transcrito y permitió determinar si alguno de estos genes variaba su expresión en alguno de los tiempos post-infección (Tabla 7).

Tabla 7:

Variables del primer experimento

Variable dependiente	Densidad de banda del transcrito
Variable independiente	Tiempo Con infección/Sin infección

Tras verificar que los datos seguían una distribución normal, se realizó el análisis estadístico ANOVA de las densidades absolutas calculadas con cada uno de los genes (PR1, PR13 y GSNOR) en cada periodo de tiempo bajo la siguiente hipótesis:

La media de las densidades absolutas del gen evaluado es significativamente diferente en al menos uno de los periodos de tiempo.

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para observar diferencias significativas entre las medias.

2.9. Experimento 2: Ensayo Hormonal y de Patogénesis en hojas desprendidas de babaco y jigacho infectadas con *Fox*

2.9.1. Inducción con hormonas e infección con *Fox*

El ensayo hormonal se realizó sobre hojas de babaco y hojas de jigacho, con el objetivo de determinar la influencia de inductores hormonales (ácido salicílico y ácido jasmónico combinado o no con etileno) o nitroprusiato sobre la patogenicidad de *F. oxysporum*.

Se prepararon tres soluciones hormonales y una solución de nitroprusiato (precursor del NO): 200 mL de ácido salicílico (PM=138,2 g/mol) 1 mM, 200 mL de ácido jasmónico (Metil jasmonato, PM= 224,3 g/mol) 200 μ M, 200 mL de etileno (Etefón, PM=144.5 g/mol) 500 μ M y 50 mL de Nitroprusiato 500 μ M. A cada solución se le agregó Twin20 como agente surfactante para romper la tensión superficial del agua.

Cada solución individual fue aplicada como tratamiento, además de una combinación del AJ y etileno. Cada tratamiento tuvo de tres réplicas, es decir, tres hojas en cámaras húmedas sobre las

que se aplicó la solución correspondiente por aspersión con un atomizador hasta humedecer toda la superficie de la hoja. Se asignaron dos grupos control; un control negativo a la aplicación de hormonas pero con asperjado de esporas del hongo y un control negativo a la aplicación de hormonas y asperjado de esporas, los cuales fueron reemplazados con solución salina estéril.

Después de 24 h de la aplicación de las soluciones se realizaron lesiones con una aguja estéril en la superficie de las hojas de manera homogénea para todas las muestras, y se asperjó la solución de esporas sobre los tratamientos hormonales y el grupo control.

Se tomaron datos de Fv/Fm (eficiencia cuántica máxima del FSII) con ayuda del fluorómetro de clorofila OS-30p (*Opti Sciences, Inc.*) desde el día 1 al día 8 y 11 para babaco y jigacho respectivamente.

2.9.2. Análisis estadístico de datos

Este experimento se realizó individualmente tanto en jigacho como en babaco, definiendo los mismos tratamientos y controles. Para los tratamientos se aplicó una hormona o combinación de hormonas vegetales (AS, AJ, AJ/Etileno; AJ/Et o Nitroprusiato; NP) y luego se inoculó el hongo en todos los tratamientos. Los controles consistieron en la aplicación de hongo únicamente y el blanco no posee ninguna intervención. Tanto los tratamientos como los controles se realizaron con tres réplicas (Figura 6).

Se tomaron medidas de la eficiencia cuántica máxima del Fotosistema II (Fv/Fm), el que deriva de la fluorescencia de clorofila. Estos valores se emplearon como variable de respuesta, la cual indica la severidad de la enfermedad causada por *Fox* (Tabla 8).

Se tomaron los valores Fv/Fm hasta 11 días después de la infección en el caso del jigacho y 8 días después en el caso del babaco. Las mediciones se realizaron en cuatro puntos localizados en cada una de las hojas y se sacó el promedio para establecer un valor de referencia del Fv/Fm de toda la hoja.

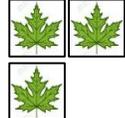
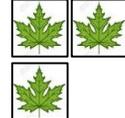
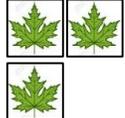
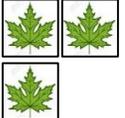
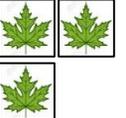
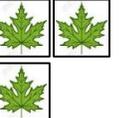
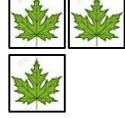
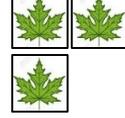
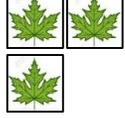
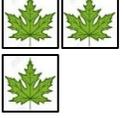
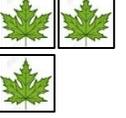
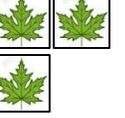
Especie	Blanco (B)	Control con hongo (Ch)	Tratamientos con hormonas			
			AS	AJ	AJ/Et	NP
Babaco						
Jigacho						

Figura 6: Tratamientos para evaluar la influencia de inductores hormonales sobre hojas de *Vasconcellea* infectadas con Fox.

Nota: Cada tratamiento y control se realizó por triplicado.

Tabla 8:

Variables del segundo experimento

Variable dependiente	Eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm)
Variabes independientes	Hormona aplicada
	Tiempo post-aplicación (Días)

Se realizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y de igualdad de varianza en una muestra de datos de cada tratamiento para determinar que se trataban de datos normalmente distribuidos. Se realizó una prueba ANOVA de cada día en que se tomaron los datos para establecer si hay diferencias entre cada tratamiento hormonal, siendo la hipótesis la siguiente:

Al menos uno de los tratamientos hormonales presenta una media de los valores Fv/Fm distinta al resto.

En los casos que se rechazó la hipótesis nula se procedió a realizar la prueba de Tukey para discernir entre los tratamientos que dieron resultados significativamente diferentes.

CAPITULO III: RESULTADOS

3.1. Establecimiento de un sistema de infección en cámara húmeda

Los datos obtenidos al evaluar cada método de infección según la clave descrita en la Tabla 1 de la sección 2.7., han sido representados en la Figura 7 mediante diagramas de cajas.

En los diagramas de caja se puede observar las medias, las cuales están representadas por las barras que cortan las cajas (Figura 7 y Tabla 9), y se puede observar que el método de infección por punción (B) es el más efectivo. Esto fue corroborado por la prueba de Kruskal-Wallis, en la cual se observaron diferencias significativas en el día 11 post infección en el método de infección por punción con un IS=5 (mediana) (Anexo 4).

Cabe mencionar que los tres métodos de infección causaron enfermedad en el babaco, dándole apariencia amarillenta y finalmente necrótica. Sin embargo el jigacho no desarrolló los síntomas de la enfermedad y no se encontraron diferencias significativas de los datos de IS tomados en los días 6, 8 y 11 post infección.

Tabla 9:

Medias correspondientes a los diagramas de caja de los valores de IS bajo diferentes métodos de infección con Fox en hojas de babaco y jigacho.

Planta	Tratamiento	Medias		
		6 dpi	8 dpi	11 dpi
Babaco	A	1,6	2	2,3
	B	1,3	2,6	4,3
	C	0,5	0,5	2,5
	Ctrl 1	0	0,5	1
	Ctrl 2	0	1	0,5
Jigacho	A	0	0	1
	B	0	0	0
	C	0	0	0,5
	Ctrl 1	0	0	0
	Ctrl 2	0	0	0

A= Asperjado superficial; B= Punción superficial; C=Infección por absorción del peciolo; Ctrl 1=Control sin punción; Ctrl 2=Control con punción.

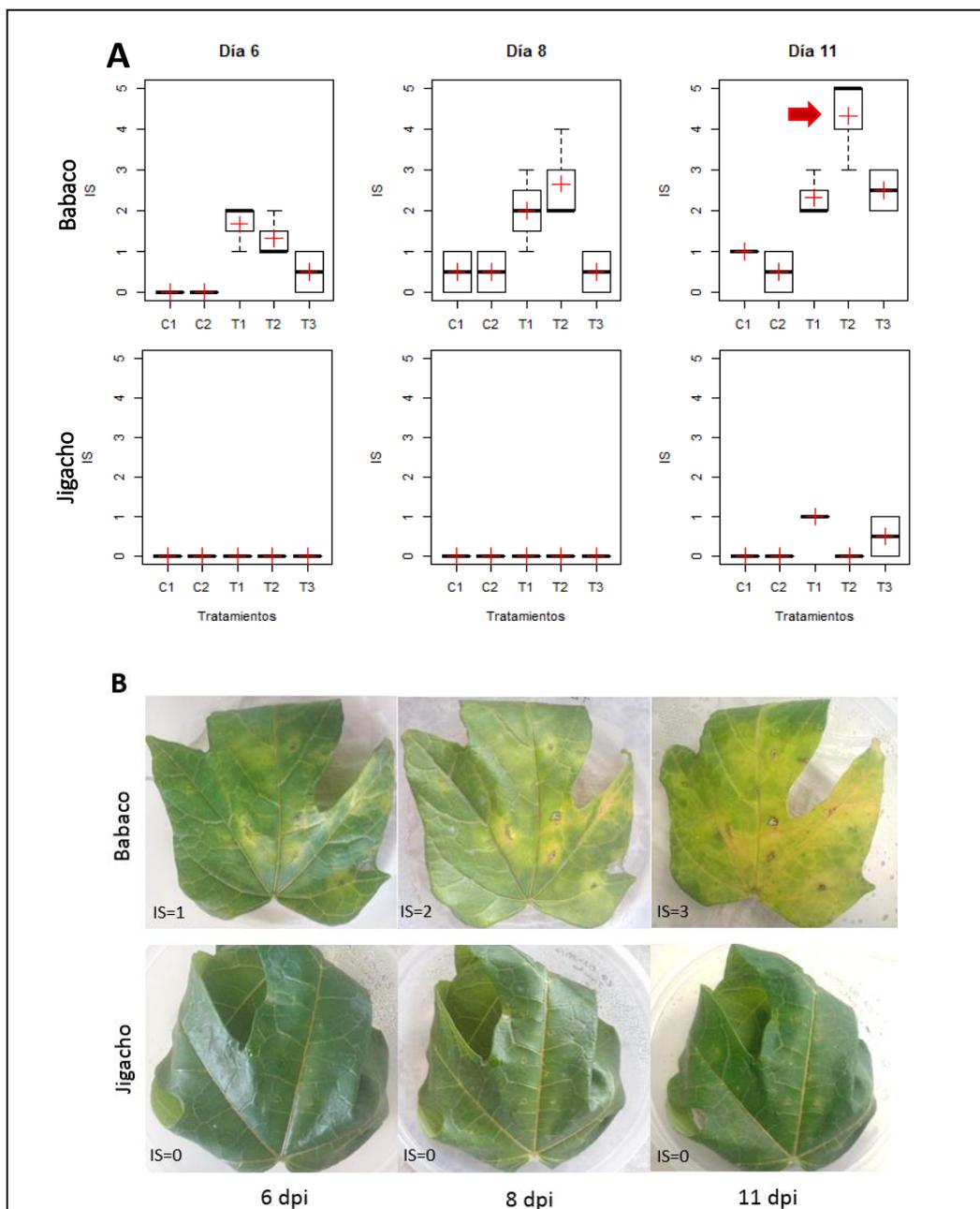


Figura 7: Resultados del diseño de un sistema de infección en hoja desprendida.

Nota: A: Se presentan diagramas de caja del progreso de los síntomas en la escala aplicada (0: ausencia de amarillamiento o necrosis; 1: 1-25% de amarillamiento y necrosis en la superficie foliar, 2: 26-50% de amarillamiento y necrosis en la superficie foliar, 3: 51-75% de amarillamiento en la superficie foliar, 4: 76-100% de amarillamiento y necrosis de la superficie foliar, 5: muerte total de la hoja). La flecha roja muestra las diferencias significativas, las cruces rojas indican la media de cada tratamiento. B: Fotografías de hojas de babaco y jigacho infectadas con *Fox* mediante punción y asperjado de la solución de esporas (B) con su respectivo IS.

Al analizar los aislados de las hojas que desarrollaron la enfermedad hasta el nivel 5 en babaco, se determinó la presencia de microconidios y clamidosporas con la morfología de *Fox* (Figura 8), confirmando que este era el hongo invadió las hojas.

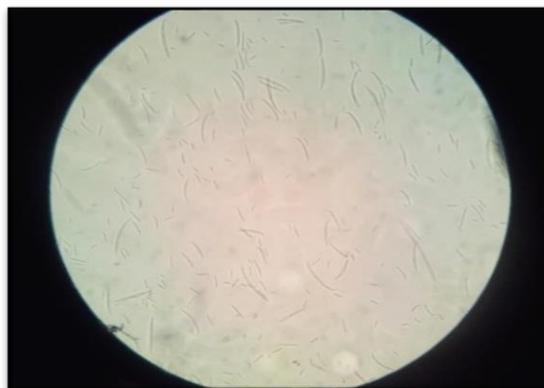


Figura 8: Observación al microscopio (40x) de microconidios y clamidosporas extraídos una muestra con el método B. en babaco.
Nota: Los microconidios presentan forma ovalada y las clamidosporas tienen forma de haz alargada.

En base a este resultado, se seleccionó el método de infección B (punción y asperjado superficial de la hoja) para continuar con los siguientes procesos experimentales.

3.2. Diseño de cebadores y estandarización

Las secuencias utilizadas como base para el diseño de cebadores (Anexo 1) se obtuvieron del genoma de jigacho para el gen PR2, y de la base de datos del NCBI para los genes PR13 y GSNOR. Estos últimos no se encontraron en el genoma de jigacho, por lo que se utilizó secuencias su pariente cercano *Carica papaya*. Los cebadores para el gen NAD5 provienen de manzana (*Malus domestica*) (Chuan Lee & Chang, 2006).

Tras seguir los parámetros definidos en la Tabla 3 de metodología para el diseño de cebadores, se obtuvieron las secuencias que se presentan en la Tabla 10. Se verificaron los parámetros termodinámicos la temperatura de *melting* y la energía de Gibbs para la formación de horquillas, homodímeros o heterodímeros de los cebadores en el programa Oligoanalyzer® (Tabla 11).

Tabla 10:

Características de los cebadores de los genes a ser analizados.

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)
PR2	Vh_PR2_F	GCGAAATCAAGACGGATGTC	251
	Vh_PR2_R	GCAATGGAGAACATTCAACG	
PR13	Vh_Thi2.1_F	TCAGAACCACCACACACAATC	193
	Vh_Thi2.1_R	CAACCTCACAATAGCGTCCTC	
GSNOR	Vh_GSNOR_F	TCCCATGAAGTGGTAGAGTGG	213
	Vh_GSNOR_R	GTTGAAAGTGTGGCGAAGG	
NAD5	mt-F2	GCTTCTTGGGGCTTCTTGTTCGATA	185
	mt-R1	ATCTCCAGTCACCAACATTGGCAT	

Tabla 11:

Características termodinámicas de los cebadores diseñados.

Gen	Nombre	T° melting [°C]	Datos termodinámicos [ΔG kcal.mole ⁻¹]		
			Horquillas	Homodímeros	Heterodímeros
PR2	Vh_PR2_F	60,61	-0,87	-3,61	-4,77
	Vh_PR2_R	59,13	-1,16	-5,37	
PR13	Vh_Thi2.1_F	59,43	1,85	-1,57	-1,6
	Vh_Thi2.1_R	59,75	0,83	-3,61	
GSNOR	Vh_GSNOR_F	59,97	-1,44	-5,38	-5,02
	Vh_GSNOR_R	60,67	1,14	-3,61	
NAD5	mt-F2	59,2	0,3	-6,76	-6,97
	mt-R1	58,8	-1,91	-6,97	

3.2.1. Estandarización de temperatura de hibridación

La corrida electroforética de los amplicones de cada gen con su respectivo gradiente de 14°C se observan en la Figura 9. Las bandas observadas permiten determinar que las temperaturas óptimas de *annealing* donde el producto es más intenso, con ausencia de productos secundarios y donde hay menor formación de dímeros son 52°C para PR2 y GSNOR, y 56°C para PR13 y NAD5.

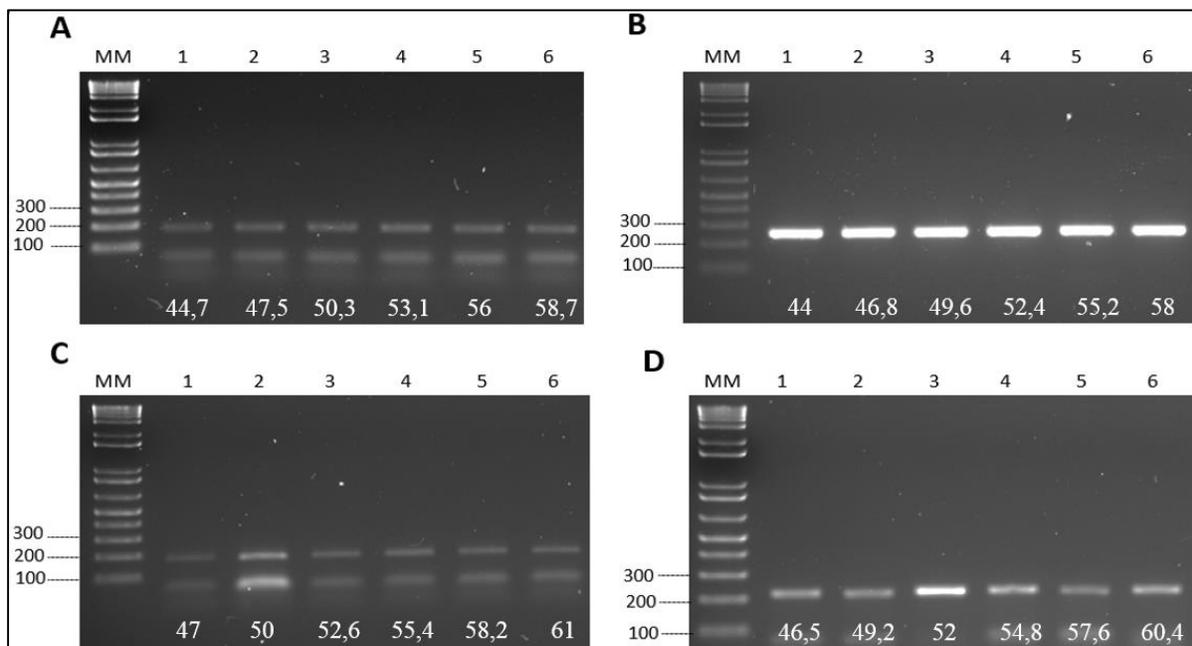


Figura 9: Electroforesis de productos de PCR en gradiente.

Nota: A: Amplificación del gen NAD. B: Amplificación del gen PR2. C: Amplificación del gen PR13. D: Amplificación del gen GSNOR. En la parte inferior de cada carril del gel de electroforesis se ubica la temperatura en °C a la que corresponde el amplicón. MM: Marcador molecular TrackIt® 1kb (Invitrogen).

3.2.2. Estandarización de ciclos

En la Figura 10 se muestran los productos de PCR con intensidades que varían de acuerdo al número de ciclos, la intensidad del producto a 45 ciclos corresponde a la fase tardía de la curva de PCR donde la cantidad de fluorescencia tiende al máximo.

El número de ciclos óptimo se seleccionó en base a la intensidad de la banda que representa la mitad o ligeramente menos de la mitad de la intensidad que se observa en el producto a 45 ciclos. El número de ciclos seleccionado es de 32 para NAD5, 28 para PR2, 34 para GSNOR y 32 para PR13.

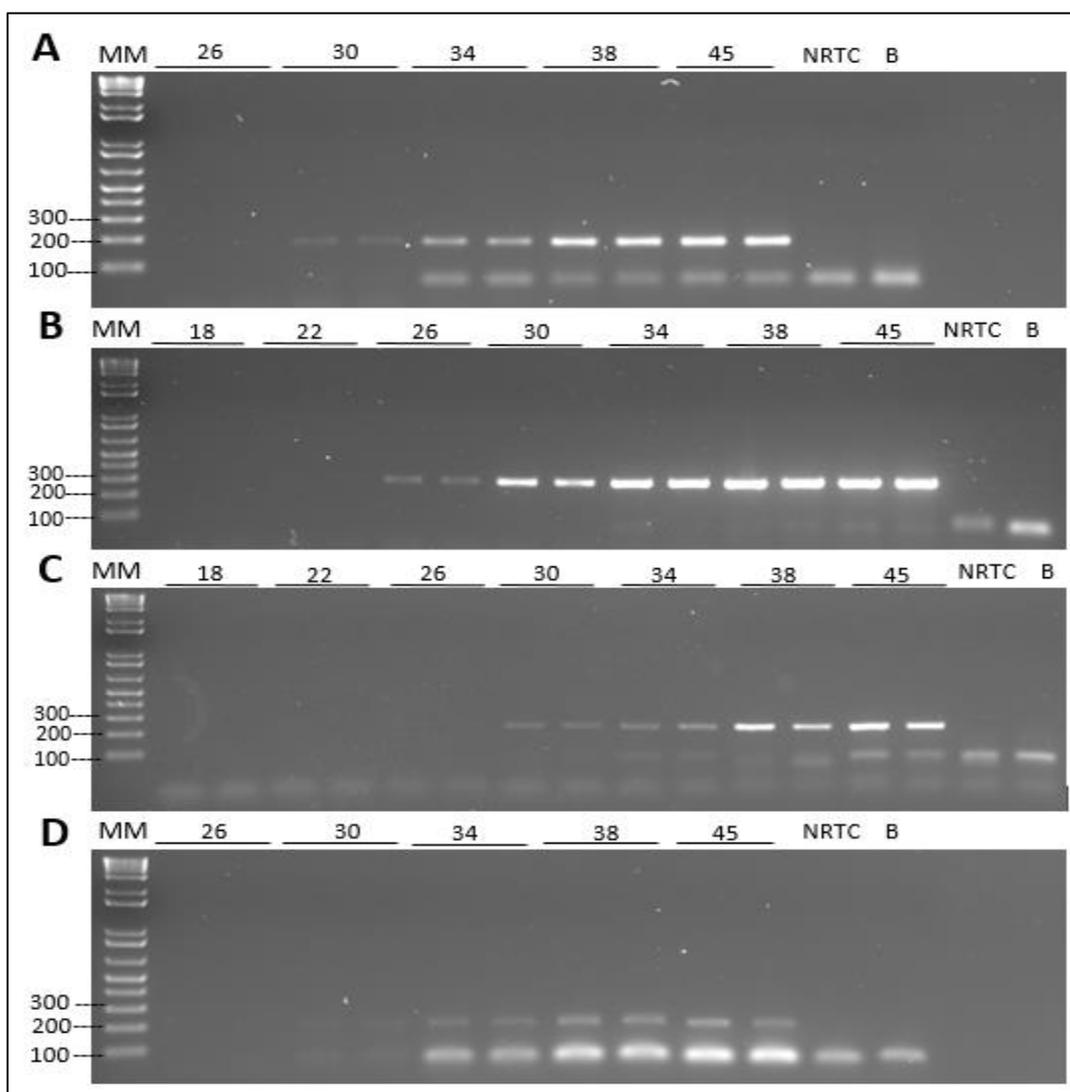


Figura 10: Estandarización de número de ciclos.

Nota: A: NAD5. B: PR2. C: GSNOR. D: PR13. En la parte superior de cada carril de corrida se ubica el número de ciclos que le corresponde, cada reacción se realizó por duplicado. MM: Marcador molecular TrackIt® 1kb (Invitrogen); NRTC: control sin transcripción reversa; B: blanco.

3.2.3. Amplificación de los genes en ADN

Luego de realizar PCR con cada uno de los pares de cebadores sobre ADN genómico de jigacho, se obtuvieron productos de tamaño aparentemente idéntico a los obtenidos en ADNc, lo cual

sugiere la ausencia de intrones en las regiones utilizadas para el diseño de estos cebadores. Excepto en el caso del gen PR13 donde no se presentó producto alguno.

Además, se puede observar la presencia de un producto secundario en el caso de los cebadores del NAD5 que tiene un tamaño de alrededor de 2500 pb (Figura 11).

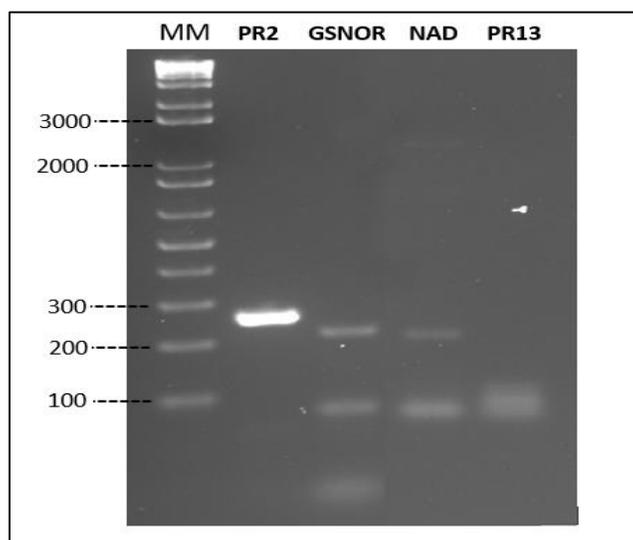


Figura 11: Electroforesis de productos de los cebadores diseñados para PR2, GSNOR, NAD5 y PR13 en ADN genómico de jigacho.

Nota: MM: Marcador molecular TrackIt® 1kb.

3.3. Experimento 1: Ensayo de Expresión de Genes PR en hojas desprendidas de Jigacho infectadas con *Fox*

3.3.1. Extracción y cuantificación de ARN.

El ARN de las 24 hojas de jigacho infectadas y controles extraídos por el método de columnas y el método de *Trizol*® se muestran en la Figura 12 y la Figura 13, respectivamente. Se determinaron los ratios 28s/18s de todas las muestras y se obtuvo un valor medio de 0.69 ± 0.16 con el método de columnas y 1.35 ± 0.14 con el método de *Trizol*®.

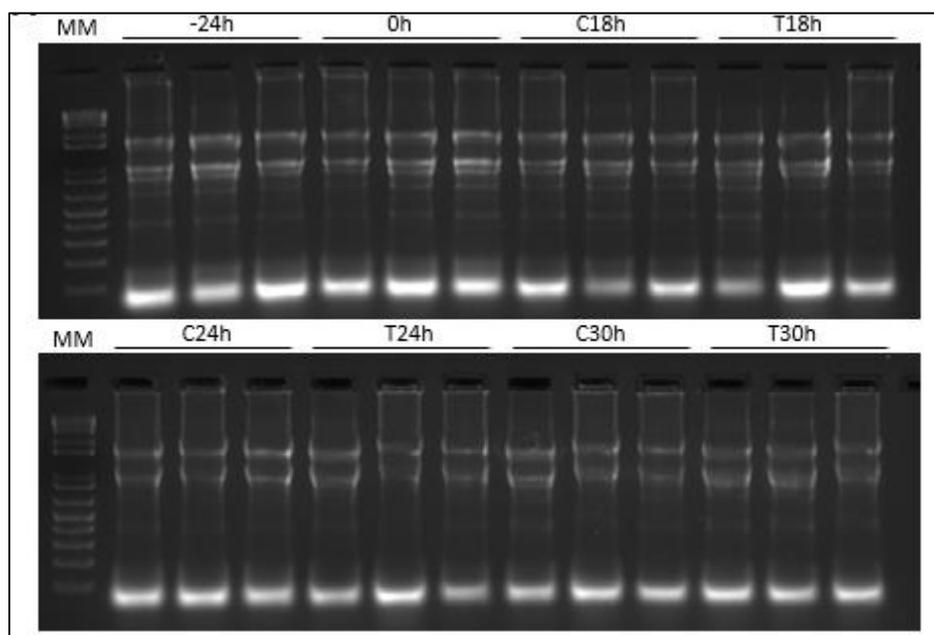


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN extraídas con el método de columnas *GeneJET Plant RNA Purification Kit*®.

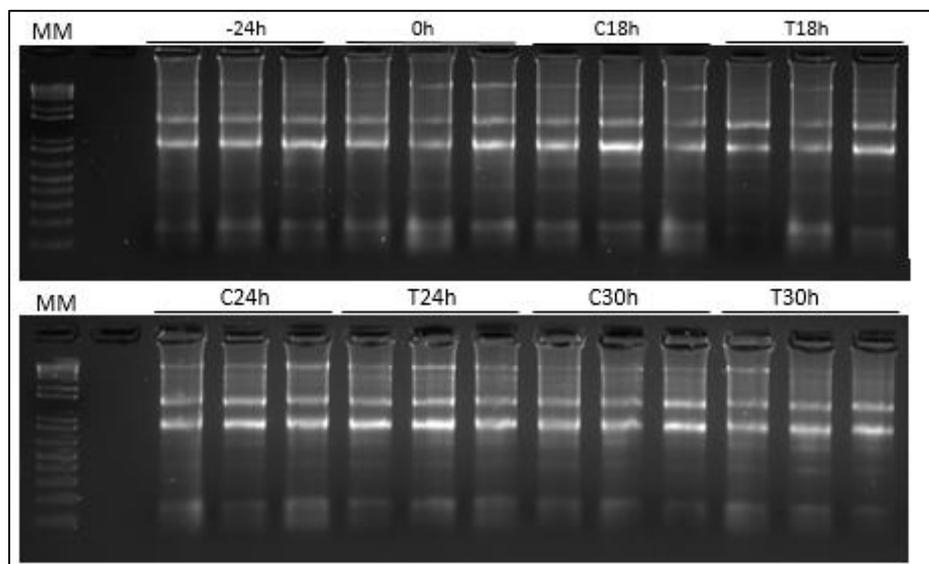


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN extraídas con el método de *Trizol*®.

Al medir la concentración por espectrofotometría se obtuvieron concentraciones medias de 944.19 ± 434.2 al aplicar el método de columnas y 2231.97 ± 786.66 al aplicar el método de *Trizol*. Los ratios de pureza 260/230 y 260/280 fueron de 2.14 ± 0.03 y 2.18 ± 0.07 con el método de columnas y 2.07 ± 0.02 y 2.1 ± 0.1 con el método de *Trizol* (Anexo 2).

3.3.2. Análisis de Transcritos.

3.3.2.1. Homogeneidad del gen de expresión constitutiva (housekeeping).

La calidad del ADNc se comprobó mediante una PCR sobre el gen constitutivo NAD5. Como se muestra en la Figura 14, todas las muestras dieron como resultado una banda del tamaño esperado (185 pb). Las bandas por debajo de los 100 pb se deben a la formación de dímeros.

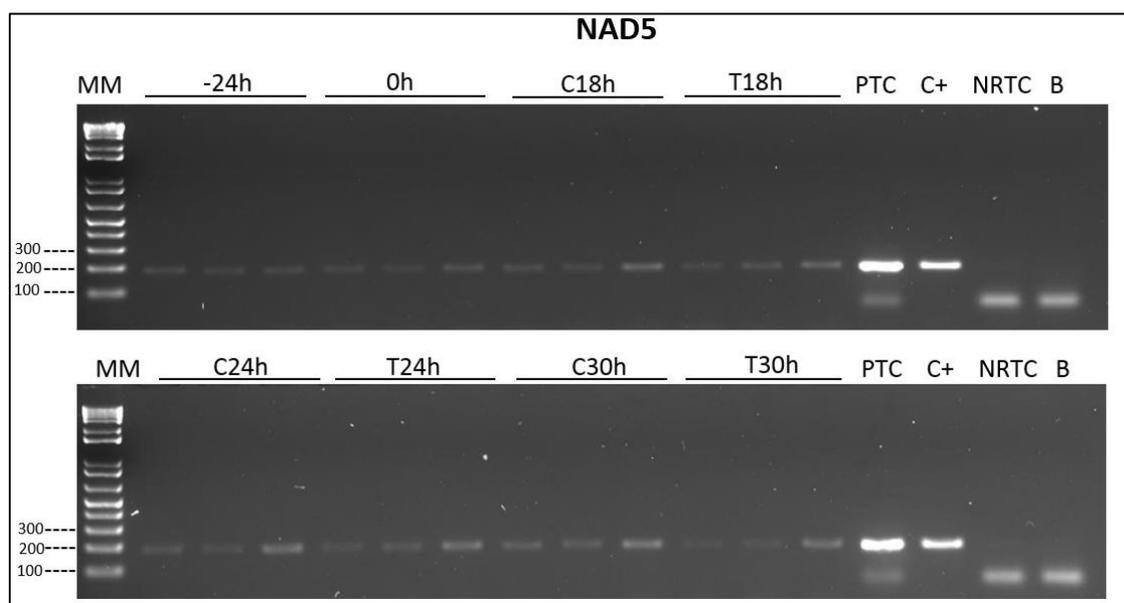


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen NAD5 sobre muestras de ADNc de jigacho.

Nota: Se emplearon muestras de hoja de jigacho infectadas (T) y no infectadas (C) con *Fox*, recogidas 24 h previo a la infección y a distintos lapsos de tiempo (0h, 18h, 24h y 30h) post-infección. MM: Marcador molecular TrackIt® 1kb. PTC: Plateau control; C+: control positivo que consiste en un pool de ADNc de todas las muestras de jigacho; NRTC: control sin transcripción reversa; B: blanco.

En la prueba ANOVA ($\alpha=0.05$) el valor-p obtenido fue de 0.877, lo cual determinó que las diferencias de las intensidades de las bandas del gen constitutivo no eran significativamente diferentes, entre los periodos de tiempo y los grupos infectados y no infectados con *Fox* (Anexo 5 y 6). Por lo tanto se puede asumir la homogeneidad del gen constitutivo entre todas las muestras.

3.3.2.2. Expresión de genes PR.

Las PCRs para amplificar los genes PR2 (Figura 15), PR13 (Figura 16) y GSNOR (Figura 17) aplicando los parámetros establecidos en la estandarización de los cebadores, dieron como resultado amplicones de longitud esperada (PR2, 251 pb; PR13, 193 pb; GSNOR, 213 pb) en todas las muestras del experimento.

La intensidad de las bandas de todos los amplicones resultantes no supera la mitad de la intensidad del PTC (*plateau control*), lo cual indica que las bandas resultantes son ideales para medir la expresión de los genes en función de su densidad.

Al evaluar las densidades medias de las bandas mediante un ANOVA ($\alpha=0.05$) se comprobó que el nivel de expresión de los genes PR2, PR13 y GSNOR antes (0h) y después (18h, 24h y 30h) de la infección mediante el tratamiento B no varía significativamente (Anexo 8), lo cual quiere decir que las variaciones de expresión de los genes que se observen en los resultados serían efecto de la infección únicamente.

Al realizar la prueba ANOVA ($\alpha=0.05$) sobre los datos de cada uno de los genes (Anexo 9) comparando los periodos de tiempo 18h, 24h y 30h se observó que las diferencias entre las medias de cada periodo no son significativas (Figura 18), y que por lo tanto los niveles de transcritos de estos genes no varían en los periodos de tiempo investigados tras la infección con *Fox*.

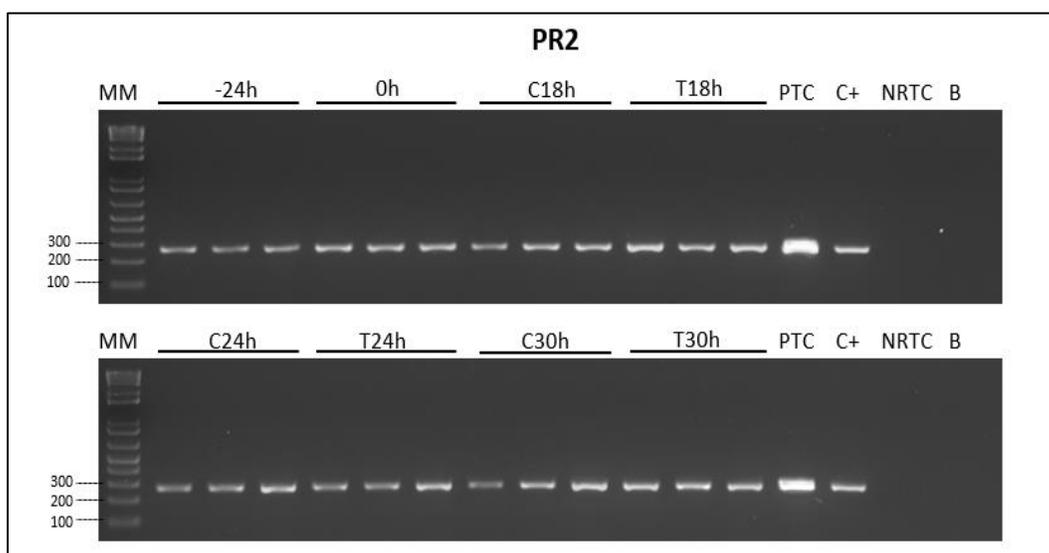


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen PR2 en muestras de ADNc de jigacho infectadas con *Fox* y sus controles sin infección a diferentes periodos de tiempo.

Nota: MM: Marcador molecular TrackIt® 1kb (Invitrogen). PTC: Plateau control; C+: control positivo; NRTC: control sin transcripción reversa; B: blanco.

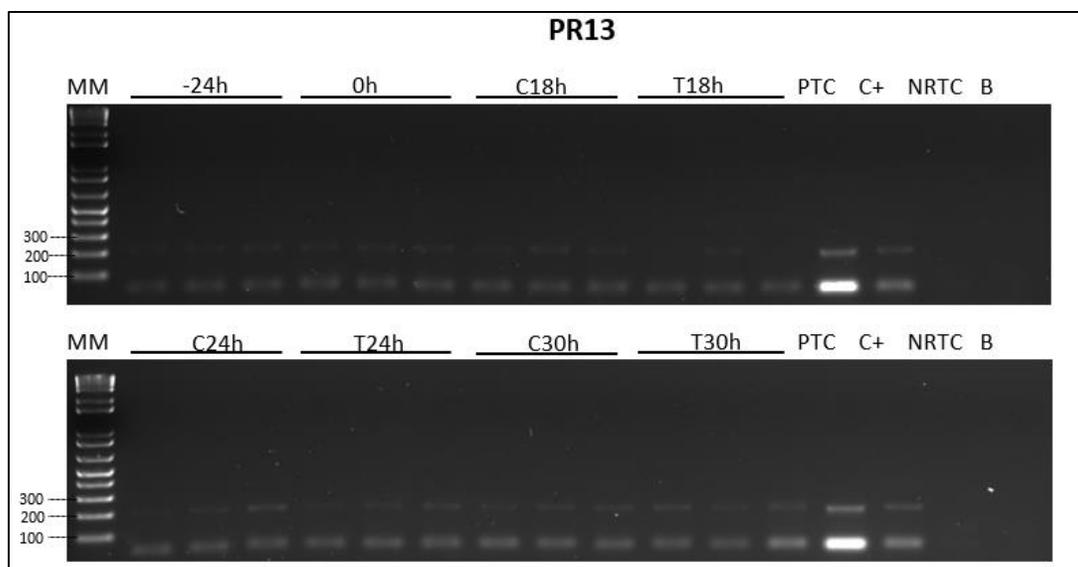


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen PR13 en muestras de ADNc de jigacho infectadas con *Fox* y sus controles sin infección a diferentes periodos de tiempo.

Nota: MM: Marcador molecular TrackIt® 1kb (Invitrogen). PTC: Plateau control; C+: control positivo que consiste en un pool de ADNc de todas las muestras de jigacho; NRTC: control sin transcripción reversa; B: blanco.

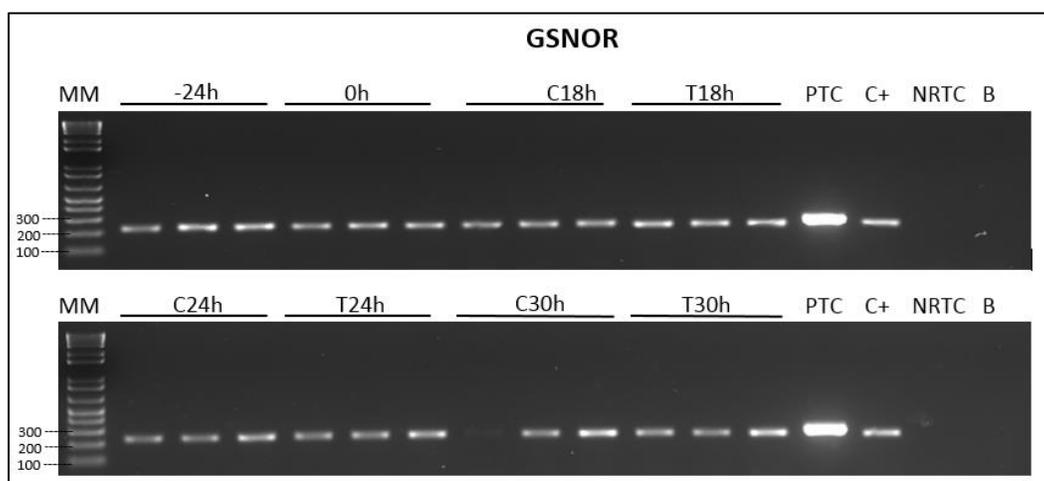


Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen GSNOR en muestras de ADNc de jigacho infectadas con Fox y sus controles sin infección a diferentes periodos de tiempo.

Nota: Marcador molecular TrackIt® 1kb (Invitrogen). PTC: Plateau control; C+: control positivo que consiste en un pool de ADNc de todas las muestras de jigacho; NRTC: control sin transcripción reversa; B: blanco.

En la Figura 18 se observa mediante un diagrama de barras el número de veces que la expresión de cada gen varió en los periodos de tiempo analizados, otorgando el valor de uno al nivel de expresión en el tiempo cero, donde la hoja fue puesta en su cámara húmeda pero no fue sometida a punciones superficiales e infección. No se observaron diferencias de expresión significativas en ninguno de los genes.

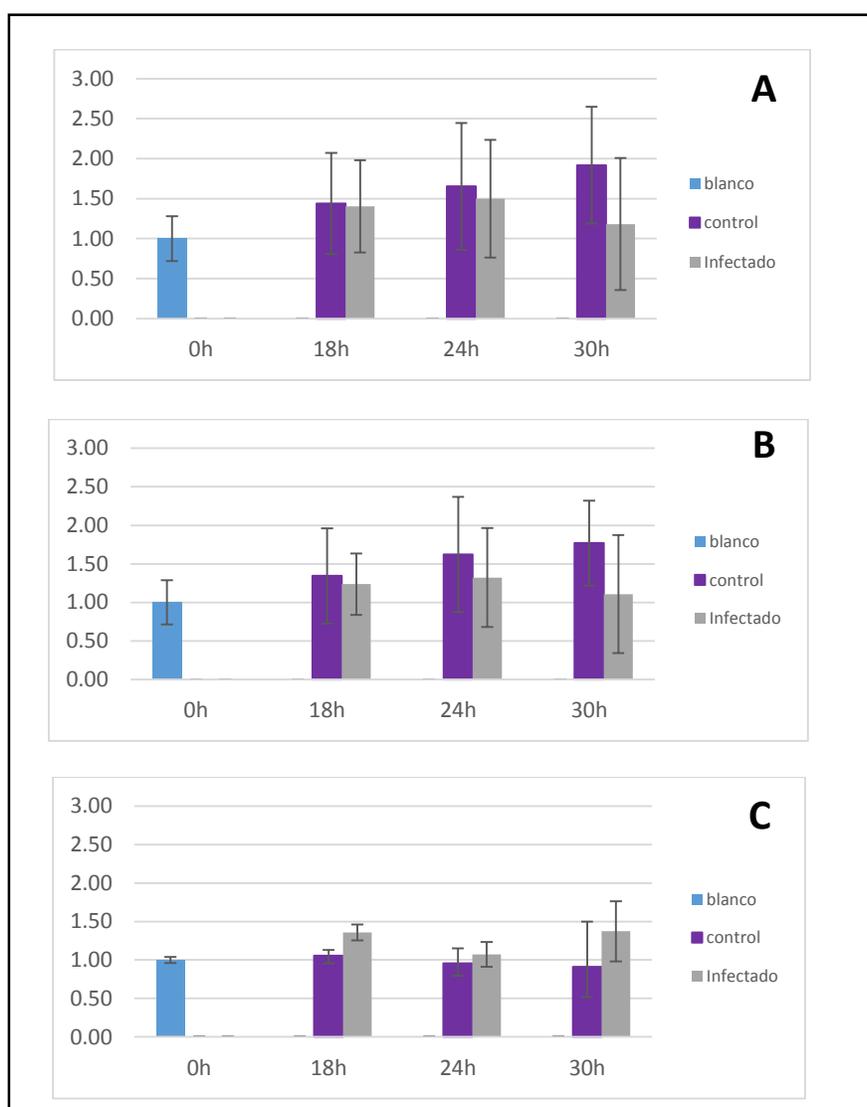


Figura 18: Diagrama de barras de los niveles de expresión de los genes PR2 (A), PR13 (B) y GSNOR (C) en jigacho con su respectiva desviación estándar.

Nota: El blanco corresponde al valor basal de la expresión del gen, tomado a tiempo 0h. El control son hojas no infectadas y los infectados son hojas inoculadas con *Fox*. No se presentaron diferencias significativas.

3.4. Experimento 2: Ensayo Hormonal y de Patogénesis en hojas desprendidas de babaco y jigacho infectadas con *Fox*.

Tras la aplicación de inductores hormonales o nitroprusiato, y la infección con hongo en hojas de babaco y jigacho se midió el parámetro fluorométrico, eficiencia máxima del FSII (Fv/Fm). Los valores Fv/Fm en jigacho y babaco se encuentran en los Anexos 10 y 11 respectivamente, y la representación en función de cada día en que se tomaron los valores está en la Figura 19.

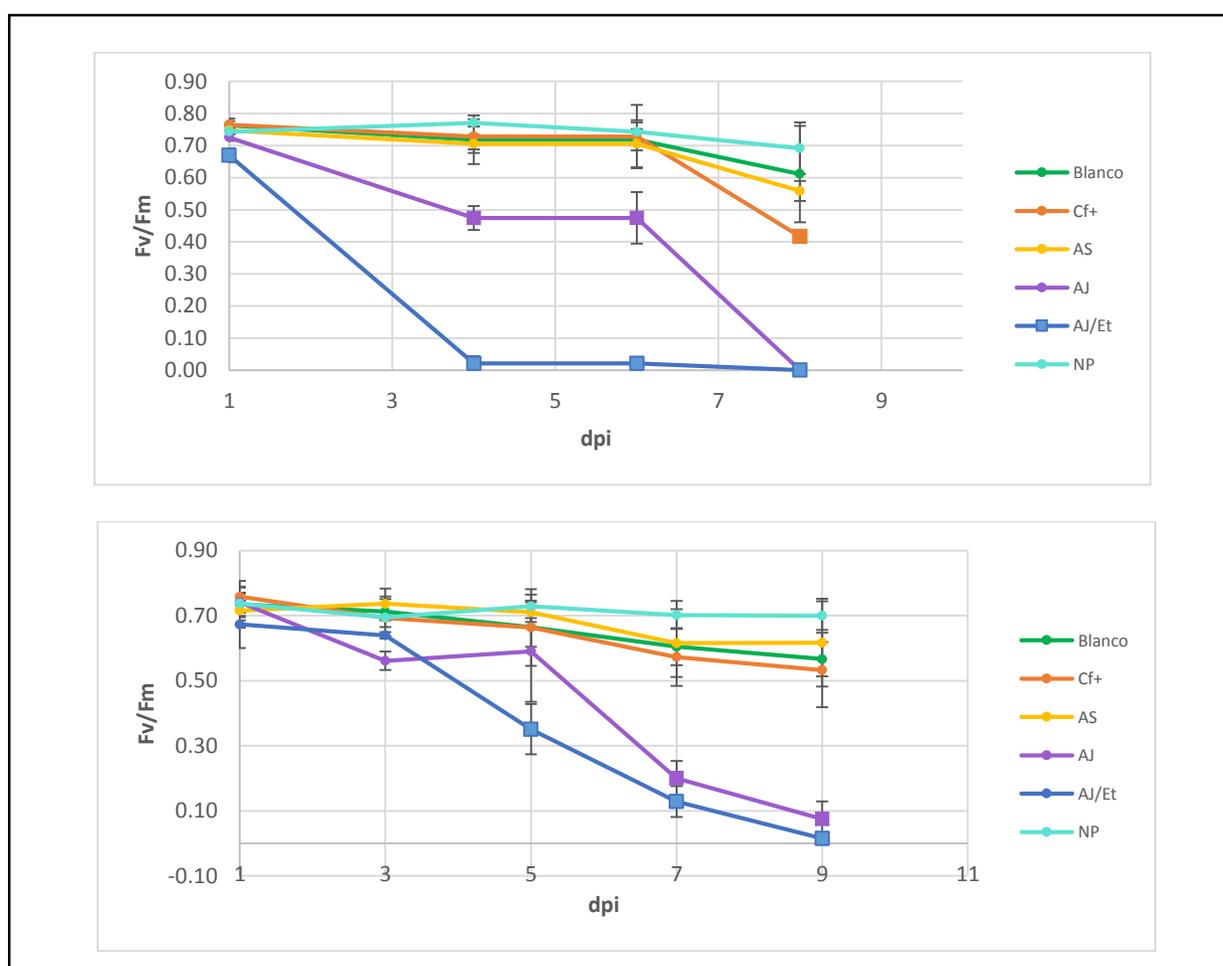


Figura 19: Diagrama de dispersión con líneas de los valores de Fv/Fm tomados de los tratamientos con diferentes inductores hormonales y no hormonales en diferentes días post infección (dpi).

Nota: Donde los controles son: Blanco, sin asperjado ni infección con *Fox*; Cf+: infectado con *Fox* únicamente. Los tratamientos hormonales infectados con *Fox* son: AS, Ácido Salicílico; AJ, Ácido jasmónico; NP, nitroprusiato. Los datos con diferencias significativas se muestran con marcas cuadradas.

El análisis de Shapiro-Wilks (Anexo 12) y el análisis igualdad de varianzas (Anexo 13) determinaron que las medidas de Fv/Fm tienen distribución normal. Se puede observar en la Figura 19 que tanto en babaco como en jigacho los tratamientos con AJ y AJ/Et provocan caída de los valores de Fv/Fm con respecto al blanco.

Mediante pruebas ANOVA se determinó que los valores de Fv/Fm sí disminuyeron significativamente en los tratamientos con AJ, AJ/Et y en el control infectado con Fox (Cf; Anexo 14) que el resto de tratamientos y controles. Además, los tratamientos con AJ y AJ/Et causaron deterioro más temprano (1 y 4 dpi) que la inoculación con sólo hongo (8dpi).

En el caso del jigacho sucedió algo similar con los tratamientos de AJ y AJ/Et, y mediante pruebas ANOVA (Anexo 15) se determinó que estos tratamientos causaron diferencias significativas en los siete y cinco dpi respectivamente, con respecto al resto de tratamientos y controles. A diferencia de lo observado en babaco, el control que fue inoculado con el hongo en jigacho no presentó deterioro en los valores de Fv/Fm.

Tabla 12:

Características de los modelos de ajuste sobre datos de los tratamientos con diferencias significativas

Especie	Tratamiento	Fórmula (y=)	R ²	Pendiente
Babaco	AJ/Et	$0,0176x^2 - 0,2214x + 0,6632$	0,98	---
	AJ	$-0,0118x^2 + 0,0109x + 0,7105$	0,90	---
	Cf+	$-0,0114x^2 + 0,0518x + 0,7563$	0,89	---
Jigacho	AJ/Et	$-0,0813x + 0,7515$	0,92	-0,0813
	AJ	$-0,0757x + 0,7969$	0,87	-0,0757

Los ajustes lineales para los tratamientos con AJ y AJ/Et y el control con infección en jigacho (Tabla 3.4.) fueron aceptables con un coeficiente de determinación $\geq 0,9$ (Er=5%), los cuales

poseen pendientes negativas que indican decaimiento de F_v/F_m en función de los días. La pendiente más pronunciada es la que se observa en el tratamiento con la combinación AJ/Et, lo cual recae en el supuesto de que este tratamiento fue más contraproducente en las hojas.

Los modelos de ajuste para los tratamientos de AJ y AJ/Et y el control con infección en babaco no siguieron una tendencia lineal, pero se aproximaron a ajustes cuadráticos (Tabla 12) que dieron un coeficiente de determinación $\geq 0,9$ ($E_r=5\%$). En el caso del AJ y el control infectado con *Fox* el modelo posee signo negativo en el término cuadrático (x^2) lo que indica que los valores de F_v/F_m declinarán con el tiempo en valores de x cuadráticos; considerando que los valores de x serán siempre enteros positivos.

Por otra parte, la regresión cuadrática de los resultados al aplicar AJ/Et en babaco posee un coeficiente positivo en su término cuadrático, sin embargo el alto coeficiente de x propicia que y (F_v/F_m) tienda a cero tempranamente al aproximarse a cuatro, lo que corresponde al cuarto día posterior a la infección.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

5.1. Sistema de infección en hoja desprendida en cámara húmeda

El sistema de infección en hoja desprendida en cámara húmeda permite reducir la cantidad de material vegetal requerido en un experimento y su ambiente aislado del exterior disminuye el riesgo de contaminación, propiciando la realización de ensayos de patogenicidad.

Sin embargo, el método de infección en hoja es una vía poco convencional de infección con *Fusarium oxysporum*, ya que es un hongo que se disemina por el suelo y coloniza desde la raíz para llegar al xilema (Michielse et al., 2009).

La colonización en hojas de babaco observada (prueba de Koch) sugiere que la infección por los tres métodos realizados fue efectiva. También se determinó que la infección a través de lesiones desarrolló clorosis más rápido que la infección superficial y la realizada por el peciolo, lo cual se puede deber a que las esporas del hongo ingresaron al tejido por las aperturas causadas por heridas más fácilmente que por las aperturas de los estomas o los vasos xilemáticos del peciolo, para luego proseguir con la germinación.

Es de suponer que la germinación de las esporas de *Fox* colocadas en las hojas con lesiones fue favorecida por los nutrientes expuestos, como sucede con los exudados de las raíces emitidos al suelo (Bertin, Yang, & Weston, 2003); donde ciertos elementos como los azúcares estimulan la germinación de *Fusarium* spp (Nelson, 1991).

Con el tercer método de inoculación (realizada a través del peciolo), la manifestación de síntomas tardó más, debido a que la germinación desde el punto inicial de infección y la prolongación de sus hifas por el peciolo tomaron más tiempo.

Por su parte, los resultados del ensayo de patogenicidad en hojas de jigacho no mostraron el desarrollo de los síntomas de marchitez vascular tras ninguno de los métodos de inoculación con el hongo, lo cual sugiere que el jigacho ofrece resistencia a la infección con *Fox*.

Puesto que el efecto de la inoculación por punción manifestaba más tempranamente los síntomas esperados en babaco, este fue el método seleccionado para posteriores análisis.

5.2. Susceptibilidad del babaco a *Fusarium oxysporum*

De acuerdo a estudios de infección con *Fox*, la especies resistentes permanecen asintomáticas y superan la infección, mientras que las especies susceptibles desarrollan clorosis y mueren (Beckman & Roberts, 1995; Erfeng et al., 2014). Dichos patrones se observaron al comparar la resistencia de las hojas de jigacho y las susceptibilidad de las hojas de babaco, lo cual a nivel microscópico muestra que en un cultivar resistente la infección queda restringida al sitio de inicio, mientras que en un cultivar susceptible las hifas del hongo se prolongan por la corteza hasta llegar al xilema y causan la muerte de la planta (Erfeng et al., 2014).

La susceptibilidad a infecciones en especies híbridas en contraste a la resistencia de sus padres no es algo raro. El 22,4% de las especies híbridas (Cheng, Vrieling, & Klinkhamer, 2011) son más susceptibles que sus parentales frente alguna enfermedad. La hipótesis de susceptibilidad de híbridos sostiene que la hibridación genera modelos genéticos que se pueden categorizar por su susceptibilidad o resistencia a enfermedades, lo cual depende, no sólo de la herencia de un gen específico o grupo de genes, sino del cambio íntegro de la planta (Fritz, Moulia, & Newcombe, 1999).

Las explicaciones de este fenómeno son la descomposición de la hibridización en subsiguientes generaciones (Czesak, Knee, & Gale, 2004) o que el híbrido posee un perfil de metabolitos más atractivo para los patógenos (Cheng et al., 2011).

5.3. Perfil de expresión de genes de respuesta en la defensa contra *Fusarium oxysporum*.

Este estudio no pudo determinar si alguno de los genes PR puestos a prueba (PR2 y PR13) correspondientes a las vías del AS y AJ o el gen GSNOR de la vía del NO variaron en cantidad su expresión en jigacho como respuesta de defensa a *Fox*.

Según la hipótesis emergente de los resultados de fluorescencia, se esperaría la sobreexpresión del gen PR2, que se transcribe tras la activación de la ruta del AS, así como la estabilidad o represión del gen PR13, indicador de la vía del AJ. Este último hecho se observa; sin embargo también se mantienen estables PR2 y GSNOR.

Las razones de la estabilidad observada en todos los transcritos pueden ser que los periodos de tiempo seleccionados no fueron precisos para detectar el cambio en alguno de ellos, que los genes seleccionados no responden a la infección con *Fox*, o que gran parte del tejido aún no haya respondido al patógeno, haciendo menos sensible la respuesta de expresión génica.

El rango de genes PR que son expresados en defensa de la planta contra hongos hemibiotróficos es amplio. Además, existen numerosos estudios que determinan el perfil de genes PR en otras especies frente *Fox*.

Los genes PR1 y PR2 fueron los primeros en ser identificados, lo que se determinó al infectar *A. thaliana* con *Fox*. En los mismos estudios, también se verificó la activación de la SAR, la cual acondiciona a las células para que resistan al ataque de patógenos virulentos (Brigitte &

Slusarenko, 1994). En algodón (*Gossypium hirsutum*), los principales genes PR que se activan con el ataque de *Fox* son PR10 y PR3, siendo la duración de la resistencia que confieren es prolongada (Dowd, Wilson, & McFadden, 2004). En *S. lycopersicum*, el perfil de proteínas de raíz infectada con *Fox* reveló incrementos de las proteínas quitinasa (PR3) y PR5 (Silva et al., 2017). De los genes mencionados, PR1, PR2, PR5 y PR10 han sido inducidos experimentalmente con la aplicación de AS (McGee, Hamer, & Hodges, s. f.; Molinari, Fanelli, & Leonetti, 2014; Zhie, Fan, & Chen, 1998), por lo tanto esta podría ser su vía de activación.

En cambio, el gen Thi2.1 también llamado PR13 es activado por la vía del AJ, que como hemos mencionado es la hormona de respuesta contra hongos necrotrofos. Se ha encontrado niveles aumentados de transcritos de PR13 en plántulas de *A. thaliana* que presentaban resistencia a *F. oxysporum* f sp *matthiola*, un hongo hemibiotrofo (Datta & Muthukrishnan, 1999), y plantas de *S. lycopersicum* modificadas para expresar este gen también presentaron resistencia a *F. oxysporum* f sp. *lycopersici* (*Fol*) (Chan, Prasad, Chen, Liu, & Cham, 2005; Huang & Allen, 2000). Las proteínas de tipo thionina tienen un carácter citotóxico, y el efecto de Thi2.1 en *Fox* ha sido provocar un crecimiento anormal de las hifas o inhibir su crecimiento totalmente (Huang & Allen, 2000), por lo cual no cabe descartar el gen Thi2.1 se sobreexpresen en defensa de la planta contra *Fox*.

Por lo tanto, a pesar de que los genes seleccionados en este estudio no se hayan sobreexpresado, cabe la posibilidad de que otros genes PR de respuesta a hongos hemibiotrofos sí respondan de manera esperada. Para ello, se requieren estudios de una gama más amplia de genes PR.

Finalmente, a pesar de que en nuestro estudio no se encontraron incrementos de los transcritos del gen indicador utilizado de la ruta del NO, GSNOR, hay datos de otros estudios que sustentan

la inducción de la resistencia a *Fol* en especies como *Lycopersicon esculentum* al aplicarles NO, logrando la activación de genes relacionados con la defensa, entre ellos varios PR (PR1, PR2, PR3, PR5 y PR7) (Chakraborty, Chandra, & Acharya, 2017).

No existen estudios que hayan determinado el mecanismo por el cual el NO actúa en la defensa de la planta, pero existen numerosas evidencias de que este se incrementa en respuesta a una amplia variedad de hongos patógenos (Arasimowicz & Floryszak, 2016; Asai & Yoshioka, 2009; Floryszak, Arasimowicz, Milczarek, Jelen, & Jackowiak, 2007; Schlicht & Kombrink, 2013).

5.4. Papel que desempeñan las hormonas vegetales en hojas de babaco y jgacho infectadas con *Fusarium oxysporum*.

La relación Fv/Fm ha mostrado alta sensibilidad en determinar disminución de la eficiencia del fotosistema II en plantas enfermas de antracnosis de cucurbitáceas, causada por *Colletotrichum orbiculare*, un hongo que causa lesiones en las hojas de las plantas; este parámetro detectó deterioro de la hoja incluso antes de la aparición de síntomas superficiales (Tung et al., 2013). Por ello se empleó el parámetro Fv/Fm para la valoración de los resultados.

En el experimento de asperjado hormonal los distintos tratamientos consistieron en una hormona (AS, AJ), combinación de hormonas (AJ/Et) o precursor de hormonas (NP), y posteriormente se aplicó el inóculo de esporas de *Fox*.

Los valores de Fv/Fm sugieren que las hojas tratadas con AS y NP en ambas especies no son deterioradas por el hongo, mientras que los tratamientos con AJ y AJ/Et propiciaron mayor severidad de la enfermedad en las hojas, con valores bajos de Fv/Fm.

Tanto el AS como NO activan resistencias de la planta contra hongos fitopatógenos hemibiotróficos tales como *Fox*.

Así, los resultados obtenidos concuerdan con la observación de que la aplicación exógena de AS induce su acumulación en la planta, confiriendo resistencia contra hongos hemibiotróficos observada en otros estudios (Vidhyasekaran, 2015b). Además, plantas deficientes en la producción de AS son hipersensibles a la infección con *Fox*, y desarrollan síntomas severos y colonización de los vasos xilemáticos (Di, Gomila, & Takken, 2017).

Los mecanismos por los cuales el AS confiere resistencia en la planta son la inducción de genes de defensa como PR1 (Oostendorp, Kunz, & Dietrich, 2001), PR2 y PR5 (Lemarié, Robert, & Lariagon, 2015), y el desencadenamiento de la SAR (Potlakayala, Reed, & Covello, 2007).

Por su parte, el NO también interviene en la SAR, y es un rápido inductor de la inmunidad en plantas (Bellin et al., 2013); se ha reportado que el incremento de NO ocurre previamente a la activación de la vía del AS (Tischner, Koltermann, & Haesse, 2010). Es posible que en el caso del presente estudio el NO confiera resistencia a través de dicho mecanismo.

En la respuesta en presencia de AJ del ensayo realizado, se observó deterioro de los síntomas, incluso en la planta resistente jigacho. Se sabe que el AJ activa la defensa contra hongos necrotróficos e insectos herbívoros, lo cual no incluye a *Fox* (Carvalhais, Dennis, Badr, & Tyson, 2013; Kazan & Manners, 2008).

La respuesta de las plantas en presencia de AJ y *Fox* es variada. Al inducir fusariosis en plantas con mutaciones causantes de deficiencia en la síntesis y percepción de AJ y plantas tipo salvaje, en unos casos afectó de igual forma a ambos tipos. En otros casos la enfermedad afectó más al tipo

salvaje que al mutante (Di et al., 2017; Thatcher et al., 2009). El decir que el AJ no influye en la respuesta de la planta contra *Fox* o influye negativamente, induciendo enfermedad.

Las razones por las cuales el AJ predispone a la planta a susceptibilidad al ser infectada con *Fox*, pueden ser la senescencia que induce y/o su antagonismo con la vía del AS. La cantidad de AJ (nmol AJ/g de tejido) en hojas jóvenes es baja y aumenta hasta cinco veces en la fase de senescencia (Ueda & Kato, 1980; He, Fukushige, Hildebrand, & Gan, 2002; Tan et al., 2018).

Al llegar a la fase de senescencia el tejido foliar sufre degradación de las clorofilas, lo cual da apariencia amarillenta a la hoja (Hye, Hyo, Hong, & Pyung, 2013; Leshem, 1988); en los ensayos realizados durante este proyecto, la aplicación de AJ dio resultados concordantes con este síntoma. Otro síntoma es la peroxidación de los lípidos de membrana que dan lugar a la formación de fisuras. Esto está relacionado con el incremento de ROS (Hye et al., 2013). La ruptura de membranas celulares puede ser favorable para el avance de la infección por *Fox*, ya que a través las brechas formadas el hongo logra acceder fácilmente a los nutrientes y proliferar.

La supresión que el AJ ejerce sobre el AS es otro argumento para explicar que la hoja fue afectada por *Fox* con mayor severidad en el tratamiento con AJ y AJ/Et con respecto al control (Ch+). En estudios previos se observó que la interacción entre *A. thaliana* desprovista de la capacidad para detectar AJ y *Pythium irregulare* (oomiceto necrótrofo) resultó en la acumulación de AS. Es decir, que el AJ estaba inhibiendo al AS (Adie, 2007; Derksena et al., 2013). En plantas de tabaco se observó que la aplicación de AJ inhibía la producción de proteínas PR dependientes de AS (Adie, 2007; Niki et al., 1998), y que forman parte de la respuesta defensiva contra biótrosos y hemibiótrosos tales como *Fox*.

En definitiva, la hipótesis que emerge de los resultados antedichos es que, dado que el AS activa las defensas que proveen en la planta mayor resistencia contra *Fox*, la presencia del AJ ejerce una supresión de dichas defensas y da paso al desarrollo de la enfermedad en la planta.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. Las hojas desprendidas conservadas en cámara húmeda se pueden infectar con *Fusarium oxysporum* de manera que se desarrollen síntomas de marchitez vascular.
2. La infección con *Fusarium oxysporum* en babaco presenta mayor severidad que en jigacho, ya que el babaco desarrolla completamente los síntomas de clorosis y necrosis hasta la muerte de todo el tejido, mientras el jigacho no presenta los síntomas o los presenta levemente.
3. Los niveles de los transcritos de los genes PR y gen GSNOR analizados se mantienen estables en las hojas de jigacho en los tiempos estudiados postinfección por *Fusarium oxysporum*
4. Las medidas del rendimiento cuántico máximo del fotosistema II indican que el tratamiento de las hojas con AJ y la mezcla AJ/Et facilitan y propician el ataque de *Fusarium oxysporum* tanto en babaco como jigacho, respectivamente.

Hipótesis emergente de la conclusión anterior

La vía del ácido salicílico, propia de biotrofos y hemibiotrofos, es la que actúa en jigacho al resistir a *Fusarium oxysporum*.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

1. Para la elaboración de cámaras húmedas es de especial requerimiento la limpieza de todos los materiales que estarán dentro de la cámara, como el papel toalla, el *Parafilm* y la solución Hoagland. Si no es posible su esterilización en el autoclave, deben ser limpiadas con alcohol exhaustivamente, y de esta manera no se tendrán problemas de contaminación de las muestras durante el ensayo.
2. Se recomienda que los ensayos en los cuales se tiene como fin monitorear los síntomas de una enfermedad se emplee el parámetro, índice de enfermedad (*disease index*), para ello se debe realizar un número de réplicas experimentales superior a tres, ya que esto permitirá inferir con mayor precisión el índice de progreso de la enfermedad y las diferencias significativas relacionadas.
3. En próximas investigaciones, han de ensayarse los experimentos de observación de deterioro durante más tiempo. Esto es de especial importancia para saber si el asperjado de AS sobre babaco induce resistencia.
4. Los análisis de transcritos deben realizarse con controles positivo y negativo, en babaco, de verificación de la actividad de las colonias del patógeno. También hay que tener en cuenta un rango de tiempo post infección más amplio para el análisis, y reconsiderar otras vías de infección en los ensayos de manera que simulen mejor lo que ocurre en condiciones naturales.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Adie, B. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defense in Arabidopsis, *19*, 1665–1681.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Nueva York: Elsevier Academic Press.
- Aradhya, M., Manshardt, R., Zee, F., & Morden, C. (1999). A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (Caricaceae) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region., *46*, 579–586.
- Arasimowicz, M., & Floryszak, J. (2016). Nitric Oxide in the Offensive Strategy of Fungal and Oomycete Plant Pathogens, *7*, 252. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00252>
- Argotti, E., Cazar, M., Motte, E., & Cedeño, V. (2011). Análisis molecular de la región ITS de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez vascular de *Vasconcellea heilbornii* y *Solanum quiotense* en Ecuador., *1*, 25-36.
- Asai, S., & Yoshioka, F. (2009). Nitric Oxide as a Partner of Reactive Oxygen Species Participates in Disease Resistance to Necrotrophic Pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*, *22*, 619-629. <https://doi.org/10.1094/MPMI -22-6-0619>
- Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar. (2003). *Cultivo de babaco en invernadero (Carica pentagona)*. Quito.
- Badillo, V. (1993). Caricaceae, *43*, 1-111.
- Badillo, V. (2000). *Carica* L. vs. *Vasconcella* St.-Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último., *10*, 74-79.

- Badillo, V. (2001). Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hil y no *Vasconcella* (Caricaceae), *11*, 75–76.
- Baker, N. (2008). Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo., 80-113.
- Balasubramanian, V., Vashisht, D., Cletus, J., & Sakthivel, N. (2012). Plant b-1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi., 1983-1990.
- Beckman, C., & Roberts, E. (1995). On the nature and genetic basis for resistance and tolerance to fungal wilt diseases of plants., *21*, 36–77.
- Bellin, D., Asai, D., Yoshioka, H., & Delledonne, M. (2013). Nitric oxide as a mediator for defense responses., *26*, 271–277.
- Birun, L., & Huifang, S. (2017). *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense., *13*, 231-233.
- Bjorkman, O., & Demmig, B. (1987). Photon yield on O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins., 489–504.
- Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update, 161-178.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.01.003>
- Bol, J., Linthorst, H., & Cornelissen, B. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection., *28*, 113-138.
- Bolar, J., Norelli, J., Hayes, C., Harman, G., & Aldwinckle, H. (2000). Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor., 72-77.

- Boter, M., Rivero, O., Abdeen, A., & Prat, S. (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*., *13*, 1577–1591.
<http://dx.doi.org/10.1101/gad.297704>
- Brigitte, M., & Slusarenko, A. (1994). Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by a predisposing infection with a pathogenic isolate of *Fusarium Oxysporum*, 377-383.
- Brunner, A., Yakovlev, I., & Strauss, S. (2004). Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies., *4*, 14.
- Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E., & Dong, X. (2011). *Arabidopsis lox3 lox4* double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest., 25-33.
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Reze, N., Lesch, M., Kaiser, W., & Baudouin, E. (2011). Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*., *189*, 415-427.
- Carr, C., Sánchez, M., Alfaro, F., Vilalta, R., Sandoval, J., & Guzmán, M. (2017). Marchitez por *Fusarium* o mal de Panamá del Babano y otras Musáceas.
- Carvalhais, L., Dennis, P., Badr, D., & Tyson, G. (2013). Activation of the Jasmonic Acid plant defence pathway alters the composition of rhizosphere bacterial communities, *8*, 1-5.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056457>
- Chakraborty, N., Chandra, S., & Acharya, K. (2017). Biochemical basis of improvement of defense in tomato plant against *Fusarium* wilt by CaCl₂, *23*, 581–596.

- Chamizo, A., Sanz, E., Llamas, A., Galvan, A., & Fernandez, E. (2016). Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>
- Chan, Y., Prasad, V., Chen, C., Liu, P., & Cham, M. (2005). Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack, *221*, 386–393. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1459-3>
- Chang, P., Cheah, K., Narasimka, M., Hasegawa, P., & Bressan, R. (1995). Osmotin gene expression is controlled by elicitor synergism, 620–626.
- Cheng, D., Vrieling, K., & Klinkhamer, P. (2011). The effect of hybridization on secondary metabolites and herbivore resistance: implications for the evolution of chemical diversity in plants, *10*, 107–117.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on, *1*, 581-585. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Chong, J., Pierre, M., Atanassova, R., Werk, W., Fritig, B., & Saindrenan, P. (2001). Free and Conjugated Benzoic Acid in Tobacco Plants and Cell Cultures. Induced Accumulation upon Elicitation of Defense Responses and Role as Salicylic Acid Precursors. <https://doi.org/10.1104/pp.125.1.318>
- Chuan Lee, S., & Chang, Y. (2006). Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA, *15*, 187-196.

- Cueva, D. (2007). *Producción de Inoculantes a base de Trichoderma spp. para el control de Fusarium oxysporum f. sp. caricae en injertos de babaco (Vasconcellea heilbornii cv. babaco)*. Universidad de las Fuerzas Armadas «ESPE», Quito.
- Czechowski, T., Bari, R., Stitt, M., Scheible, W., & Udvardi, M. (2004). Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes, *38*, 366–379.
- Czesak, M., Knee, M., & Gale, R. (2004). Genetic architecture of resistance to aphids and mites in a willow hybrid system, *93*, 619–626.
- Dane, F., & Dalgıç, O. (2005). The effects of fungicide benomyl (benlate) on growth and mitosis in onion (*Allium cepa* L.) root apical meristem, *119–128*.
- Datta, S., & Muthukrishnan, S. (1999). The role of thionins in the resistance of plants. En *Pathogenesis-Related Proteins in Plants* (p. 221). CRC Press.
- De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., & Ceci, L. (2002). PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes, *347-348*.
- Deese, D., & Stahmann, M. (1962). Pectic enzymes in *Fusarium*-infected susceptible and resistant tomato plants, *255-260*.
- Derksen, H., Rampitschb, C., & Daayfa, F. (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance, *207*, 79– 87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.004>

- Desmond, O., Manners, J., Stephens, A., Maclean, D., & Schenk, P. (2008). The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat, *9*, 435–445.
- Di, X., Gomila, J., & Takken, F. (2017). Involvement of salicylic acid, ethylene and jasmonate acid signaling pathways in susceptibility of tomato for *Fusarium oxysporum*, 1-40.
- Dowd, C., Wilson, L., & McFadden, H. (2004). Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, 654–667.
- Doxey, C., Yaish, M., Moffatt, B., Griffith, M., & McConkey, B. (2007). Functional divergence in the *Arabidopsis* b-1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction, 1045–1055.
- Durner, J., Wendehenne, D., & Klessig, D. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP ribose, *95*, 10328–10333.
- Durrant, W., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance, 185–209.
- Duyens, L. (1963). Mechanisms of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence, 353–372.
- Ebrahim, S., Usha, K., & Singh, K. (2011). Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism, 1043-1054.

- El Comercio. (2011). El babaco es un cultivo exótico bien apetecido. Recuperado de <https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/babaco-cultivo-exotico-apetecido.html>
- Ellis, C., & Turner, J. (2001). The Arabidopsis mutant *cev1* has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens, *13*, 1025–1033.
- Emani, C., Garcia, J., Lopata- Finch, E., Pozo, M., Uribe, P., Kim, D., & Cook, C. (2003). Enhance fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *T.virens*, 321-336.
- Epple, P., Apel, K., & Bohlmann, H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*, *9*, 509-520. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.509>
- Erb, M., Glauser, G., & Robert, C. (2002). Induced immunity against belowground insect herbivores- activation of defenses in the absence of a jasmonate burst, 629-640.
- Erfeng, L., Gang, W., Yuhong, Y., Jiling, X., Zhenchuan, V., & Bingyan, X. (2014). Microscopic analysis of the compatible and incompatible interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* and cabbage, 1-13.
- Estrella, F. (2001). Persistencia y Capacidad Infecciosa del Hongo Fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* en Residuos Vegetales de Melón. En *Almería*. España: Universidad de Almería. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=_aZMAQAAQBAJ&pg=PA74&lpg=PA74&dq=fusarium+oxysporum+in+cultivars&source=bl&ots=0YlhMX4XVG&sig=-

bPRS6b1xBYfTBIYy0Fk-

cl36Ks&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjJnu33z8vUAhXDOT4KHdIsAXA4WhDoAQh

CMAY#v=onepage&q=fusarium%20oxysporum%20i

Fabara, J., Bermeo, P., & Barberán, X. (1985). *Manual del cultivo de babaco*. Quito: Editorial Universitaria.

Falk, A., Feys, B., Frost, L., Jones, J., Daniels, M., & Parker, J. (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in Arabidopsis has homology to eukaryotic lipases, 3292-3297.

Farmer, E., & Ryan, C. (1992). Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors, 129-134.

Feechan, A., Kwon, E., & Yun, B. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance, *102*, 8054–8059.

Fernández, M. (1979). *Introducción a la Fitopatología* (Tercera). Buenos Aires: INTA.

Floryszak, J., Arasimowicz, M., Milczarek, G., Jelen, H., & Jackowiak, H. (2007). Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen, *175*, 718-731.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02142.x>

Fonseca, S., Adie, B., Porzel, A., & Kramell, R. (2009). 7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate, 344–350.

- Fraser, R. (2015). Evidence for the occurrence of the “pathogenesis-related” proteins in leaves of healthy tobacco plants during, *19*, 69-76.
- Freire, D. (2015). *Reproducción asexual del Babaco (Vasconcellea x heilbornii Cv.) sobre portainjertos de chamburo (Vasconcellea cundinamarcensis) y toronche (Vasconcellea stipulata)*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo.
- Fritz, S., Moulia, C., & Newcombe, G. (1999). Resistance of hybrid plants and animals to herbivores, pathogens, and parasites, *30*, 565–591.
- Garbeva, P., Gera Hol, W., Temorshuizen, A., Kowalchuk, G., & De Boer, W. (2014). Fungistasis and general soil biostasis: a new synthesis, *43*, 469–477.
- García, P. (2011). *Evaluación de la tolerancia de cinco accesiones de Vasconcellea a Fusarium sp. como posible portainjertos para Babaco (Vasconcellea x heilbornii) bajo cubierta plástica en la estación experimental del Austro de INIAP*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodiére, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., & Métraux, J. (2008). Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of the Arabidopsis, *147*, 1279–1287.
- Gaupels, F., Kuruthukulangarakoola, G., & Durner, J. (2011). Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence, *11*, 707-714.
- Genetics Home Reference. (2006). MT-ND5 gene. Recuperado de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-ND5>

- Gentile, A., Deng, S., Malfa, L., Distefano, G., Domina, F., Vatale, A., & Tribulato, E. (2007). Enhance resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cineria* in transgenic lemon plants expressing a *T. harzianum* chitinase gene, 1446-1451.
- Gimenez-Ibanez, S., & Solano, R. (s. f.). Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens, 4, 7-12.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting Mechanisms of Defense against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens, 43, 205-227.
- González, I., Arias, Y., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la infección *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*-Tomate, 27, 1-7.
- Hara, M., Thomas, B., Cascio, M., Bae, B., Hester, L., Dawson, V., & Snyder, S. (2006). Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade, 3887–3889.
- Hayat, S., Fariduddin, Q., Ali, B., & Ahmad, A. (2005). Effect of salicylic acid on growth and enzyme activities of wheat seedlings, 433-437.
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D., & Gan, S. (2002). Evidence Supporting a Role of Jasmonic Acid in Arabidopsis Leaf Senescence, 128, 876-885.
<https://doi.org/www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.010843>.
- Helmuth, R. (2000). *Manejo Integrado de Plagas en Cultivos de la Amazonía Ecuatoriana*. Escuela Superior Politécnica Ecológica Amazónica.
- Henrissat, B. (1999). *Classification of chitinase modules*. Switzerland: Burkhauser Basel.

- Hondo, D., Hase, S., Kanayama, Y., Yoshikawa, N., Takenaka, S., & Takahashi, H. (2007). The LeATL6 -associated ubiquitin/proteasome system may contribute to fungal elicitor-activated defense response via the jasmonic acid-dependent signaling pathway in tomato, *20*, 72–81.
- Huang, Q., & Allen, C. (2000). Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants, *57*, 77–83.
- Hung, C., Huang, C., Tsai, W., Wang, H., & Chen, Y. (2003). Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Brassica campestris* seeds, 13-22.
- Hye, W., Hyo, K., Hong, N., & Pyung, L. (2013). Plant leaf senescence and death – regulation by multiple layers of control and implications for aging in general, *126*, 4823–4833. <https://doi.org/10.1242/jcs.109116>
- Kautsky, H., & Hirsch, A. (1931). Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation, *19*, 964.
- Kazan, K., & Manners, J. (2008). Jasmonate signaling: Toward an integrated view, *146*, 1459–1468.
- Kliebenstein, D. (2004). Secondary metabolites and plant/environment interactions: a view through *Arabidopsis thaliana* tinted glasses, 675-684.
- Kothari, K. (2016). Rice stress associated protein 1 (OsSAP1) interacts with aminotransferase (OsAMTR1) and pathogenesis-related 1a protein (OsSCP) and regulates abiotic stress responses, *7*, 1057.

- Kunkel, B., & Brooks, D. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense, *5*, 325–331.
- Laloi, C., Apel, K., & Danon, A. (2004). Reactive oxygen signalling: the latest news, 323–328.
- Laurence, M., Summerell, B., & Liew, E. (2012). High levels of diversity in *Fusarium oxysporum* from non-cultivated ecosystems in Australia, *116*, 289–297.
- Lee, H., León, J., & Raskin, J. (1995). Biosynthesis and mechanism of salicylic acid, *92*, 4076–4079.
- Lemarié, S., Robert, A., & Lariagon, C. (2015). Both the Jasmonic Acid and the Salicylic Acid Pathways Contribute to Resistance to the Biotrophic Clubroot Agent *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis*, *11*, 2158-2568. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv127>
- Leshem, Y. (1988). Plant senescence processes and free radicals, *5*, 39-49.
- Leslie, C., & Romani, R. (1988). Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid, *140*, 833–837.
- Leubner-Metzger, G. (2003). Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening, 171-34.
- Li, C., Chen, S., Sun, Q., Kuang, R., Zuo, R., Zheng, J., & Yi, G. (2011). *fgal* gene clone and diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *9*, 709–715.
- Li, C., Li, Y., Yu, L., & Huang, B. (2011). Effects of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* toxin on the ultrastructure of banana leaves, 158–164.

- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D., & Dumer, J. (2010). Redox regulation of NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide, *22*, 2894–2907.
- Lopes, J., Valadares, N., Morales, D., Rosa, D., Araújo, H., & Beltramini, L. (2009). Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*, 871-879.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria, *63*, 541-556.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>
- MacRae, E. (2007). Extraction of plant RNA. En *Methods in molecular biology* (Vol. 353). New Jersey: Humana Press.
- Mahlein, A., Oerke, E., & Steiner, U. (2012). Recent advances for sensing plant disease for precision crop protection, *133*, 197–209.
- Maxwell, K., & Johnson, G. (2000). Chlorophyll fluorescence- A practical guide, 659-668.
- McGee, J., Hamer, J., & Hodges, T. (s. f.). Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*.
- Memelink, J. (1990). Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns, *14*, 119-126.
- Merino, D. (1989). *El cultivo de Babaco*. Mundiprensa.
- Michielse, C., Van Wijk, R., & Reijnen, L. (2009). Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *trought large insertional muta*.
- Mohammadi, M., & Karr, A. (2002). b-1,3-Glucanase and chitinase activities in soybean root nodules, 245–256.

- Molinari, S., Fanelli, E., & Leonetti, P. (2014). Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in Mi-1-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes, *15*, 255-264. <https://doi.org/10.1111/mpp.12085>
- Montes, B. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos, 73-82.
- Mora, A., & Earle, M. (2001). Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, 1-9.
- Narvaez, J., Florin, J., & Ryan, A. (1999). Positional Specificity of a Phospholipase Activity Induced by Wounding, Systemin, and Oligosaccharide Elicitors in Tomato Leaves, *11*, 2249-2260.
- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R., & Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants, *53*, 1237–1247.
- Nelson, P. (1981). Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. En *Fungal Wilt Diseases of Plants* (pp. 51–80). New York: Academic.
- New England BioLabs. (2018). PCR. Recuperado de <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/pcr>
- Ng, T., Lam, S., & Fong, W. (2003). A homodimeric sporamin-type trypsin inhibitor with antiproliferative, HIV reverse transcriptase inhibitory and antifungal activities from wampee (*Clausena lansium*) seeds, 289-293.

- Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., & Ohnishi, Y. (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves, *39*, 500–507.
- Ochoa, J., & Fonseca, G. (2000). First Report of Fusarium Wilt of Babaco (*Carica × heilbornii* var. *pentagona*) in Ecuador, *84*, 199. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.199A>
- Olivain, C., & Alabouvette, C. (1997). Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*, *399*, 345–356.
- Oliveira, H., Justino, G., Sodek, L., & Salgado, I. (2009). Amino acid recovery does not prevent susceptibility to *Pseudomonas syringae* in nitrate reductase double-deficient *Arabidopsis thaliana* plants, 105-111.
- Oostendorp, M., Kunz, W., & Dietrich, B. (2001). Induced disease resistance in plants by chemicals, *107*, 19–28.
- Ortega-Galisteo, A. (2012). S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress, *63*, 2089–2103.
- Pacin, A., González, H., Etcheverry, M., Resnik, S., Vivas, L., & Espin, S. (2003). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador, 87–92.
- Palacios, R. (2004). Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario de plantas en Colombia, 67-77.
- Pecenková, T., Pleskot, R., & Žárský, V. (2017). Subcellular Localization of *Arabidopsis* Pathogenesis-Related 1 (PR1) Protein, *18*, 1-13. <https://doi.org/10.3390/ijms18040825>

- Perchepped, L., Balagué, C., Riou, C., Claudel-Renard, C., Rivière, N., Grezes-Besset, B., & Roby, D. (2010). Nitric oxide participates in the complex Interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*, 23, 846-860.
- Petre, B., Major, I., Rouhier, N., & Duplessis, S. (2011). Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar, 11-33.
- Ploetz, R. (2005). Panama disease, an old nemesis rears its ugly head: Part 1, the beginnings of the banana export trades. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2005-1005>
- Popova, L., Pancheva, V., & Uzunova, A. (1997). Salicylic acid : Properties, biosynthesis and physiological role, 23, 85-93.
- Potlakayala, S., Reed, D., & Covello, P. (2007). Systemic acquired resistance in canola is linked with pathogenesis-related gene expression and requires salicylic acid, 97, 794–802.
- PremierBiosoft. (2018). PCR Primer Design Guidelines. Recuperado de http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html
- Rakashanda, S., Qazi, A., Majeed, R., Rafiq, S., Dar, R., & Masood, A. (2013). Plant Protease Inhibitors with Antiproliferative Activity Against Human Cancer Cells, 3975-3978. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.6.3975>
- Raskin, I. (1992a). Role of salicylic acid in plants, 43, 439-463.
- Raskin, I. (1992b). Salicylate, a new plant hormone, 99, 799-803.

- Rasul, S., Dubreuil-Maurizi, C., Lamotte, O., Koen, E., Poinssot, B., Alcaraz, G., & Jeandroz, S. (2012). Nitric oxide production mediates oligogalacturonides-triggered immunity and resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*, 1483-1499.
- Reeck, G., Kramer, K., Baker, J., Kanost, M., Fabrick, J., & Behnke, C. (1997). Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects, 157-183.
- Renner, T., & Specht, C. (2012). Molecular and Functional Evolution of Class I Chitinases for Plant Carnivory in the Caryophyllales, 2971-2985.
- Robles, A., Gómez, R., & Macas, F. (2014). Estudio de la Ptoxicidad de Aislados de *Fusarium* spp. Asociados a la Marchitez Vascular de Babaco en Loja-Ecuador, 3.
- Robles, A., Salinas, D., & Armijos, W. (2014). Estudio de la variabilidad morfológica de aislados fúngicos asociados con la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*) en Loja, Ecuador, 33-44.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., & Kaiser, W. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro, 53, 103-110.
- Romejin-Peeters, E. (2004). *Biodiversity of the genus Vasconcellea (Caricaceae) in Ecuador: a morphological approach*. Universidad de Ghent, Ghent.
- Romero, I., Fernandez-Caballero, C., Goni, O., Escribano, M., Merodio, C., & Sanchez-Ballesta, M. (2008). Functionality of a class I b-1,3-glucanase from skin of table grapes berries, 641–648.

- Rout, E., Nanda, S., & Joshi, R. (2016). Molecular characterization and heterologous expression of a pathogen induced PR5 gene from garlic (*Allium sativum* L.) conferring enhanced resistance to necrotrophic fungi, 345-360.
- Roy-Barman, S., Sautter, C., & Chattoo, B. (2006). Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP1 in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses, 435–446.
- Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H., & Hunt, M. (1996). Systemic acquired resistance, 1809-1819.
- Sahai, A., & Manocha, M. (1993). Chitinases of fungi and plants: Their involvement in morphogenesis and hostparasite interaction, 317-338.
- Salgado, S. (2012). *Inductores de resistencia a TuMV en Arabidopsis thaliana (L)*. Colegio de Postgraduados, Texcoco.
- Sawada, H., Shim, I., & Usui, K. (2006). Induction of benzoic acid 2-hydroxylase and salicylic acid biosynthesis-modulation by salt stress in rice seedlings, *171*, 263–270.
- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases, 183-197.
- Schlicht, M., & Kombrink, E. (2013). The role of nitric oxide in the interaction of *Arabidopsis thaliana* with the biotrophic fungi, *Golovinomyces orontii* and *Erysiphe pisi*, *4*, 351. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00351>
- Schreiber, M., Karlo, J., & Kovalick, G. (1997). A novel cDNA from *Drosophila* encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen 5, and plant group 1 pathogenesis-related proteins, *191*, 135–141.

- Schroth, M., & Hildebrand, D. (1964). Influence of plant exudates on root infecting fungi, 2, 101-132.
- Selitrennikoff, C. (2001). Antifungal proteins, 2883–2894.
- Sessa, G. (1995). Dark induction and subcellular localization of the pathogenesis-related PRB-1b protein, 28, 537–547.
- Setterblad, C., Vidal, S., & Palva, E. (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in Arabidopsis in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*, 430–438.
- Shah, M., Raghupathy, V., & Veluthambi, K. (2009). Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*, 239-244.
- Shewry, P. (2003). Tuber storage proteins, 755-769.
- Silva, T., Almeida, C., Malafaia, C., Oliveira, M., Silva, M., & Correia, M. (2017). Analysis of protein profile of tomato root infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 16, 1-10. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16027209>
- Soria, N. (1997). Babaco, fruto con potencial en el Ecuador y el mundo, 9, 35-43.
- Soria, N., & Viteri, P. (1997). *Guía para el cultivo de babaco en el Ecuador*. Quito: INIAP.
- Sossountzov, L., Ruiz-Avila, L., Vignols, F., Jolliot, A., Arondel, V., Tchang, F., & Kader, J. (1991). Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene, 923-933.

- Spelbrink, B., Dilmac, N., Allen, A., Smith, T., Shah, D., & Hockerman, G. (2004). Differential antifungal and calcium channelblocking activity among structurally related plant defensins, 2055–2067.
- Stec, B. (2006). Plant thionins – the structural perspective, 1370–1385.
- Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B., Molina, A., Schulze-Lefert, P., & Somerville, S. (2006). Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes, 18, 731–746.
- Stenesh, J. (1989). *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Strawn, M., Marr, S., Inoue, K., Inada, N., Zubieta, C., & Wildermuth, M. (2007). Arabidopsis isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses, 282, 5919–5933.
- Swarupa, K., Ravishankar, V., & Rekha, A. (2014). Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana, 239, 735–751.
- Tada, Y., Spoel, S., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., & Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins, 321, 952–956.
- Takken, F., & Rep, M. (2010). The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*, 309-314.

- Tan, X., Fan, Z., Shan, W., Yin, W., Kuang, J., & Lu, W. (2018). Association of BrERF72 with methyl jasmonate-induced leaf senescence of Chinese flowering cabbage through activating JA biosynthesis-related genes, *5*, 22. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0028-z>
- Thatcher, L., Manners, J., & Kazan, K. (2009). *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in *Arabidopsis*, *58*, 927–939. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03831.x>
- ThermoFisher Scientific. (2018). Taq DNA Polymerase (Native and Recombinant). Recuperado de <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/pcr-enzymes-master-mixes/taq-dna-polymerase-enzymes/taq-dna-polymerase.html>
- Thevissen, K., Kristensen, H., Thomma, B., Cammue, B., & Francois, I. (2007). Therapeutic potential of antifungal plant and insects defensins, 966–971.
- Thompson, D., & Jenkins, S. (1985). Pictorial assessment key to determine fungicide concentrations that control anthracnose development on cucumber cultivars with varying resistance levels, *69*, 833–836.
- Tischner, R., Koltermann, M., & Haesse, H. (2010). Early responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Verticillium longisporum*, *141*, 373–378.
- Tobias, D., Manoharan, M., Pritsch, C., & Dahleen, L. (2010). Co-bombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin like protein genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Conlon), 631-639.

- Tung, J., Goodwin, P., & Hsiang, T. (2013). Chlorophyll fluorescence for quantification of fungal foliar infection and assessment of the effectiveness of an induced systemic resistance activator, *136*, 301–315.
- Ueda, J., & Kato, J. (1980). Isolation and Identification of a Senescence-promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.), *66*, 246-249.
- Valarers, M. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. Universidad de Extremadura, Badajoz.
- Van der Does, D., Leon-Reyes, A., Koornneef, A., Van Verk, M., Rodenburg, N., Pauwels, L., & Pieterse, C. (2013). Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCF COII -JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59, *25*, 744–751.
- Van Droogenbroeck, B., Breyne, P., Goetghebeur, P., Romeijn-Peeters, E., Kyndt, T., & Gheysen, G. (2002). AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador, *105*, 289–297.
- Van Droogenbroeck, B., Kyndt, T., Maertens, I., Romeijn-Peeters, E., Scheldeman, X., Romero-Motochi, J. P., ... Gheysen, G. (2004). Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, *108*(8), 1473-1486. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1575-7>
- Van Loon, L., Rep, M., & Pieterse, C. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, 135–162.

- Van Loon, L., & Van Strien, E. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, 85-97.
- Vidhyasekaran, P. (2010). Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms, 499.
- Vidhyasekaran, P. (2015a). Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity, 27-95.
- Vidhyasekaran, P. (2015b). Salicylic Acid Signaling in Plant Innate Immunity. En P. Vidhyasekaran, *Plant Hormone Signaling Systems in Plant Innate Immunity* (Vol. 2, pp. 27-122). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9285-1_2
- Vigers, A., Wiedemann, S., Roberts, W., Legrand, M., & Selitrennikoff, C. (1992). Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal, 155-161.
- Viteri, P. (1992). *El Cultivo del Babaco en el Ecuador*. Quito: INIAP.
- Wang, D., Amornsiripanitch, N., & Dong, X. (2003). A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants, 2, 123.
- Wang, G., Peng, J., Dai, P., Deng, G., & Huang, J. (2007). ITS sequence and PCR protocol for detection of banana wilt disease resulted from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, 1-5.
- Wang, J., & Ng, T. (2006). Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots, 349-353.
- White, R. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to Tobacco mosaic virus, 99, 410-412.

- Wijekoon, P., Goodwin, V., & Hsiang, T. (2008). Quantifying fungal infection of plant leaves by digital image analysis using Scion Image software, *74*, 94-101.
- Woodward, A., & Bartel, C. (2005). Auxin: Regulation, Action and Interaction, *95*, 707-735.
- Xing, D., Lai, Z., Zheng, Z., Vinod, K., Fan, B., & Chen, Z. (2008). Stress- and pathogen-induced Arabidopsis WRKY48 is a transcriptional activator that represses plant basal defense, *1*, 459–470.
- Yaish, M., Doxey, A., McConkey, B., & Griffith, M. (2006). Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity, 1459–1472.
- Yang, C., Dong, Z., & Wang, Z. (2011). Cloning and comparative analysis of MAPK gene from *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense Race 1 and 4, *32*, 94–98.
- Yockteng, R., Almeida, A., Yee, S., Andre, T., Hill, C., & Specht, C. (2013). A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next generation sequencing and gene expression analysis, *1*, 1-6. <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1300070>
- Yu, D., Chen, C., & Chen, Z. (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression, *13*, 1527–1539.
- Yun, B., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N., Le Bihan, T., Yu, M., & Spoel, S. (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity, *478*, 264–268.
- Zander, M., Chen, S., Imkampe, J., Thurow, C., & Gatz, C. (2012). Repression of the Arabidopsis thaliana jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by TGA-interacting glutaredoxins depends on their C-terminal ALWL motif, *5*, 831–840.

- Zander, M., La Camera, S., Lamotte, O., Métraux, J., & Gatz, C. (2009). Arabidopsis thaliana class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses.
- Zareie, R., Melanson, D., & Murphy, P. (2002). Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*, 1031-1039.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms, 389–395.
- Zheng, Z., Qamar, S., Chen, Z., & Mengiste, T. (2006). Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens, 48, 596–605.
- Zhie, X., Fan, B., & Chen, Z. (1998). Induction of PR-1 proteins and potentiation of pathogen signals by salicylic acid exhibit the same dose response and structural specificity in plant cell cultures, 11, 568–571.
- Zumbo, P. (2006). *Phenol-chloroform Extraction*. New York: Weill Cornell Medical College.