



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A DEFENSA VEGETAL EN PLANTULAS DE BANANO TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE UN EXTRACTO DE ALGAS MARINAS

Yohana Katherine Suárez Anaya

Universidad Nacional de Colombia sede Medellín

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2018

ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES ASOCIADOS A DEFENSA VEGETAL EN PLANTULAS DE BANANO TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE UN EXTRACTO DE ALGAS MARINAS

Yohana Katerine Suárez Anaya

Trabajo de Investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias: Biotecnología

Director (a):

M.D. PhD. en Biología Molecular. Rafael Arango Isaza

Línea de Investigación:

Biología molecular

Grupo de Investigación:

Biotecnología Vegetal Unalmed-CIB

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias

Medellín, Colombia

2018

A mi madre y familia.

Por la comprensión, paciencia, apoyo y motivación durante la realización de este proyecto.

A mis amigos

Por el apoyo, palabras de aliento y momentos agradables en este reto que consistió la maestría.

Agradecimientos

Agradezco al profesor Rafael Arango Isaza por la dirección y la oportunidad de llevar a cabo el presente proyecto de investigación.

A la Corporación para Investigaciones Biológicas y la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por el apoyo y permitirme ser parte de su grupo científico y así desarrollar el trabajo aquí presentado.

A la Asociación de bananeros de Colombia AUGURA y la empresa Acadian Plant Health por la financiación del proyecto.

A Melisa Muñoz por la colaboración en la primera fase de desarrollo de esta investigación y Alejandro Rodríguez por la asesoría constante durante la ejecución de este proyecto.

A los compañeros de laboratorio del grupo Biotecnología vegetal y de los grupos de la Universidad Nacional de Colombia que me brindaron sus aportes en conocimiento, confianza, apoyo y compañía en las jornadas de desarrollo de esta investigación.

Agradezco a mi familia, especialmente a mi madre Rosario por el apoyo incondicional, la comprensión y por todo su esfuerzo a lo largo de mi vida para brindarme una formación integral.

A mis amigos cercanos por el apoyo, por los momentos de alegría y aprecio y estar allí en los momentos difíciles.

Resumen

La defensa vegetal recae en diferentes vías pertenecientes a la inmunidad innata de las células individuales que se activan como respuesta a condiciones de estrés biótico. Diferentes sustancias como moléculas intermediarias en rutas de defensa y en mecanismos de regulación energética y extractos de algas marinas como *Ascophyllum* han sido utilizados como inductores para suprimir parcialmente diversas enfermedades. Los extractos de algas marinas solos, en combinación y alternados con fungicidas han mostrado resultados satisfactorios. Se evaluó el efecto de la aplicación de un extracto de algas marinas a base de *Ascophyllum nodosum* en la inducción de cuatro genes asociados a diferentes vías de señalización de rutas de defensa en banano. Se realizaron dos aplicaciones, en el Día 0 y en el día 9 sobre plántulas de banano variedad Williams de tres meses de edad, usando concentraciones de 500, 1000 y 2000 cc/ha. Se obtuvieron muestras de tejido vegetal los días 1, 3, 6, 9, 10, 12 y 15 y se evaluó la expresión de los genes PR4, POX, PR1 y PAL por RT-QPCR. Se observó que la concentración de 2000cc/ha aumentó el nivel de expresión de los genes PR4, POX y PAL.

Palabras clave: Extracto de algas marinas, *Musa sp*, Nivel de expresión, PR4, PR1, PAL y POX

Abstract

The plant defense rests in different pathways belonging to the innate immunity of the individual cells that are activated in response to conditions of biotic stress. Different substances such as intermediary molecules in defense routes and energy regulation mechanisms and seaweed extracts such as *Ascophyllum* have been used as inducers to partially suppress various diseases. The seaweed extracts alone, in combination and alternated with fungicides have shown satisfactory results. The application of a seaweed extract based on *Ascophyllum nodosum* was evaluated in the induction of four genes associated with different defense signaling pathways in banana. Two applications in the day 0 and 9 were performed on three-month-old Williams plants using concentrations of 0, 500, 1000 and 2000 cc / ha. Plant tissue samples were obtained on days 1, 3, 6, 9, 10, 12 and 15 and the expression of PR4, POX, PR1 and PAL genes was evaluated by RT- qPCR. An induction in the expression levels of PR-4, POX and PAL was observed in the plants treated with the extract at 2000 cc / ha.

Key words: seaweed extract, *Musa* sp, Expression level, PR4, PR1, PAL y POX

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1 Algas marinas	3
1.1.1 Principales componentes de los extractos algales	4
1.1.2 Extractos de algas marinas y resistencia a enfermedades	5
1.2 Sistema inmune vegetal	7
1.2.1 Mecanismos de resistencia	8
1.2.2 Vías de defensa vegetal	9
1.2.3 Defensa vegetal en banano	11
1.3 RT-qPCR	13
1.3.1 Características de la RT-qPCR	13
1.4 Hipótesis	14
1.5 Objetivos	15
1.5.1 Objetivo general	15
1.5.2 Objetivos específicos	15
2. Diseño Metodológico	16
2.1 Identificación y validación de la amplificación en el genoma del Banano (<i>Musa</i> sp) de genes marcadores de rutas de defensa	16
2.1.1 Identificación de genes marcadores de rutas de defensa	16
Fenilalanina Amonio Liasa - PAL	18
Proteínas relacionadas con proteínas de Patogénesis PR1-PR4	19
Peroxidasa-POX	20
2.1.2 Validación de genes marcadores de rutas de defensa	21
2.1.2.1 Extracción de ARN	21
2.1.2.2 Evaluación de la calidad y cantidad del ARN	21
2.1.2.3 Digestión	22
2.1.2.4 Síntesis de cDNA	23
2.1.2.5 PCR convencional	23
2.2 Obtención del nivel de expresión de los cuatro genes seleccionados en plántulas sometidas a diferentes concentraciones del extracto	23
2.2.1 Diseño Experimental	23
2.2.2 Material vegetal	25

2.2.3	Toma de muestra.....	26
2.2.4	Procesamiento de las muestras.....	26
2.2.5	PCR en tiempo real	27
2.2.6	Análisis de la expresión génica relativa	28
2.2.6.1	Cuantificación relativa normalizada.....	28
2.2.6.2	Cuantificación $2^{-\Delta Ct}$	29
2.3	Análisis estadísticos.....	29
3.	Resultados.....	31
3.1	Identificación y validación de la amplificación en el genoma del Banano (<i>Musa</i> sp) de genes marcadores de rutas de defensa.....	31
3.2	Obtención del nivel de expresión de los cuatro genes seleccionados en plántulas sometidas a diferentes concentraciones del extracto y análisis estadísticos.	32
3.2.1	Extracción del RNA y digestión.....	32
3.2.2	Cuantificación de la expresión génica.....	33
3.2.2.1	Cuantificación de la expresión génica normalizada.....	33
3.2.2.2	Análisis de la expresión génica entre tratamientos	36
4.	Discusión.....	41
4.1	Análisis del efecto del extracto de algas marinas sobre la expresión de los genes estudiados.	41
4.1.1	Análisis de la expresión génica normalizada- Fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$	41
4.1.2	Análisis de la expresión génica entre tratamientos- Variante $2^{-\Delta Ct}$	43
5.	Conclusiones y Recomendaciones.....	49
5.1	Conclusiones	49
5.2	Recomendaciones	49
	BIBLIOGRAFÍA	51

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Representación esquemática de efectos fisiológicos elicitados por algas marinas y posibles mecanismos de bioactividad.	4
Figura 1-2 Rutas de señalización sistémicas inducidas en plantas por rizobacterias, patógenos o heridas.....	11
Figura 2-1 Genes expresados diferencialmente en Banano (<i>Musa sp</i>).....	17
Figura 2-2 Calidad del RNA.....	22
Figura 2-3 Digestión.....	22
Figura 2-4 Diseño metodológico, aplicaciones y muestreo.....	24
Figura 2-5 Diseño metodológico por día de análisis.	25
Figura 2-6 Material vegetal.....	26
Figura 3-1 PCR Convencional.	31
Figura 3-2 PCR convencional en gradiente.	32
Figura 3-3 Extracciones y digestiones de RNA.....	33
Figura 3-4 Expresión génica normalizada gen PR4.....	34
Figura 3-5 Expresión génica normalizada gen POX.....	34
Figura 3-6 Expresión génica normalizada gen PR1.....	35
Figura 3-7 Expresión génica normalizada gen PAL.....	35
Figura 3-8 Representación gráfica de los valores $2^{-\Delta Ct}$ para el gen PR-4.	37
Figura 3-9 Representación gráfica de los valores $2^{-\Delta Ct}$ para el gen POX.....	38
Figura 3-10 Representación gráfica de los valores $2^{-\Delta Ct}$ para el gen PR-1.	39
Figura 3-11 Representación gráfica de los valores $2^{-\Delta Ct}$ para el gen PAL.....	40

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1 Clasificación proteínas PR.....	19
Tabla 2-2 Secuencia de los Primers utilizados para qRT-PCR	27

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
<i>kDa</i>	Unidad de masa atómica unificada	Unidad no SI	Doceava parte de la masa de un átomo

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
μ	Prefijo del Sistema Internacional que indica un factor de 10^{-6}	μ l	Microlitro

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ANE</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i> extract
<i>ADNc</i>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<i>Ct</i>	Ciclo umbral de la PCR en tiempo real
<i>d1...d15</i>	Día 1... Día 15
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>g, mg, μg</i>	Gramos, miligramos, microgramos
<i>GADPH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<i>h, min, s</i>	Horas, minutos, segundos
<i>AJ</i>	ácido jasmonico
<i>L, ml, μL</i>	Litro, mililitro, microlitro
<i>ARNm</i>	Ácido ribonucleico mensajero
<i>PAL</i>	Phenylalanine ammonia-lyase
<i>Pb</i>	Pares de bases
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>POX</i>	Peroxidase
<i>PR1</i>	Pathogenesis-Related Protein 1
<i>PR4</i>	Pathogenesis-Related Protein 4
<i>qPCR</i>	PCR en tiempo real

Abreviatura	Término
<i>ARN</i>	Ácido ribonucleico
<i>Rpm</i>	Revoluciones por minuto
<i>RT-PCR</i>	Transcripción reversa del ARNm acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.
<i>AS</i>	Ácido Salicilico
°C	Grados Celsius

Introducción

El banano es una fruta de interés económico muy importante en África, Asia y América latina, constituye uno de los principales cultivos de alimentos tropicales y productos básicos mundiales (Li, Li, Sun, & Peng, 2016; Torres, Calderón, Rodríguez-Arango, Morales, & Arango, 2012). Sin embargo, su producción se ve afectada por diversas enfermedades que disminuyen su rendimiento ocasionando grandes pérdidas económicas. Dentro de las más significativas están el mal de panamá cuyo agente causal el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) especialmente Foc raza tropical cuatro (RT4) no tiene un método de control efectivo en campo y conduce a la muerte de la planta (Li et al., 2016), y la Sigatoka negra ocasionada por el hongo *Paracercospora fijiensis* es una costosa y perjudicial enfermedad foliar que afecta la producción y exportación del fruto (Torres et al., 2012).

Las enfermedades en banano se controlan principalmente mediante la aplicación de fungicidas químicos cuya efectividad se ha visto limitada por el uso continuo, ocasionando que se presenten cepas microbianas resistentes y por ende se aumenten los costos de producción al realizar más aplicaciones. Por ejemplo, el control de la Sigatoka negra en Latinoamérica tiene un costo estimado de 350 millones de dólares anuales (Torres et al., 2012), estos costos representan aproximadamente el 40% de los costos de producción con 40 ciclos de aplicación (Torres et al., 2012).

Actualmente se están abordando estrategias alternativas al control químico como la resistencia inducida en la cual se usan fragmentos de pared celular, moléculas intermediarias en rutas de defensa, extractos vegetales, extractos de algas marinas y químicos sintéticos para promover la defensa vegetal y así mejorar la resistencia a los patógenos (Ramkissoo, Ramsuhag, & Jayaraman, 2017; Walters, Ratsep, & Havis, 2013).

Dentro de estas alternativas de resistencia inducida, se encuentran los extractos de algas marinas, los cuales contienen diversos componentes bioactivos que actúan a través de

diferentes vías en la fisiología y metabolismo celular promoviendo diversos efectos benéficos para las plantas (Khan et al., 2009; Ramkissoon et al., 2017; Sharma, Fleming, Selby, Rao, & Martin, 2013) por lo cual han sido ampliamente aplicados en campo con efectos tales como: inducción de respuestas vegetales fisiológicas, aumento de la tolerancia vegetal a un amplio rango de factores de estrés abiótico y resistencia a enfermedades.

El potencial de los extractos de algas marinas para la supresión parcial de un amplio espectro de enfermedades en plantas ha sido probado en varios cultivos con reducciones entre el 20 al 85% (Walters et al., 2013). Ddiversos autores exponen que el principal mecanismo para la resistencia a las enfermedades estaría asociado a la inducción de defensa vegetal como lo demuestran los trabajos realizados en plantas modelo donde moléculas señal como el ácido salicílico (AS), el ácido jasmonico (AJ) y el etileno y otras moléculas como fitohormonas, antioxidantes, componentes fenólicos y flavonoides son inducidos para activar los sistemas de protección vegetal frente a patógenos con la subsecuente activación de genes de defensa, proteínas relacionadas a proteínas de patogénesis (PR) y la acumulación de componentes inhibitorios como fenoles y fitoalexinas (Ali, Ramkissoon, Ramsuhag, & Jayaraj, 2016; Li et al., 2016)

La elicitación de genes de defensa en plantas de banano mediante la aplicación de extractos de algas marinas no se ha estudiado hasta el momento. Por lo tanto, para establecer el potencial uso de extractos de algas en los cultivos de banano en Colombia, como inductores de resistencia, es importante realizar estudios sobre formas de aplicación, evaluación de la resistencia inducida a nivel genético, bioquímico y pruebas de patogenicidad.

En el presente trabajo se aborda el estudio a nivel molecular del nivel de expresión de cuatro genes marcadores de rutas de defensa: PR4, POX, PR1 y PAL los cuales codifican para las proteínas: Proteína relacionada a patogenicidad -4, Peroxidasa, Proteína relacionada a patogenicidad -1 y Fenilalanina amonio liasa, respectivamente, en respuesta a la aplicación de un extracto de *Ascophyllum nodosum* (ANE) en plántulas de Banano.

1. Marco teórico

1.1 Algas marinas

Existen aproximadamente 9000 especies de macroalgas, las cuales se clasifican de acuerdo a la pigmentación que presentan en Phaeophyta (algas marrones), Rhodophyta (algas rojas) y Chlorophyta (algas verdes). Dentro de estas, las algas marrones o pardas, han sido las que más se han empleado en el campo agrícola como enmiendas, bioestimulantes y biofertilizantes para la inducción de respuestas vegetales fisiológicas como la estimulación del desarrollo vegetal, el incremento de la floración, aumento del rendimiento, la actividad fotosintética y el contenido nutricional de los productos comestibles, la promoción de microorganismos promotores de crecimiento en la rizosfera y el aumento de la vida útil post-cosecha en productos perecederos.

Los extractos de algas marinas también han sido empleados para aumentar la tolerancia vegetal a un amplio rango de factores de estrés abiótico como salinidad, sequía, temperaturas extremas y deficiencia de nutrientes (Khan et al., 2009; Ramkissoon et al., 2017; Sharma et al., 2013). Algunas especies de algas presentan un potencial estimulador mayor ya que pueden ser utilizadas en el manejo integrado de cultivos, al elicitar mecanismos de defensa vegetal frente a diversos patógenos (Ramkissoon et al., 2017).

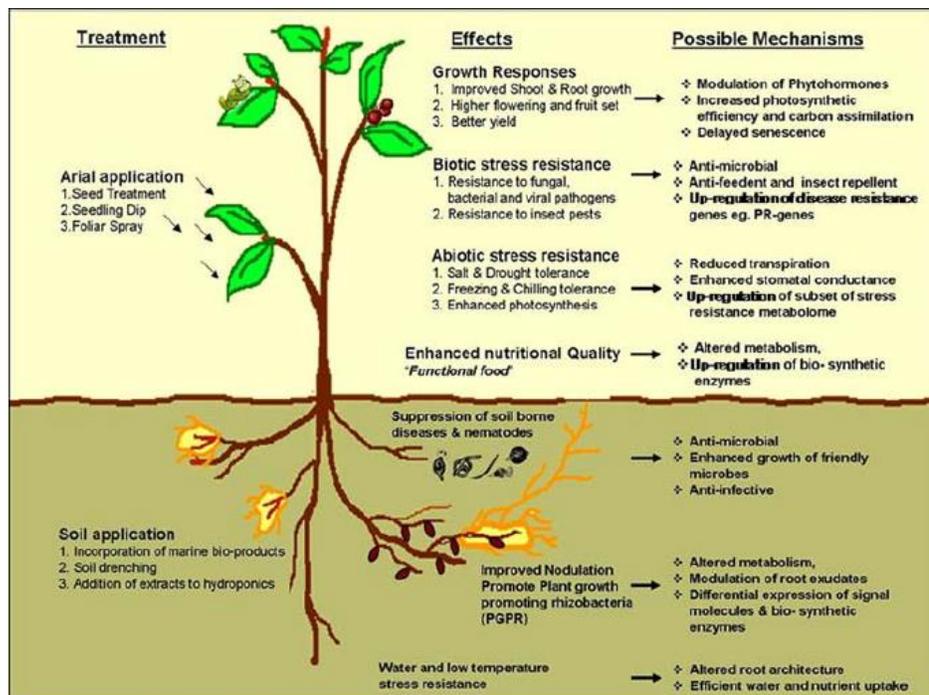
Las principales especies de algas usadas en el sector agrícola son las algas marrones: *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia maxima*, *Durvillea potatorum*, *Durvillea antarctica*, *Fucus serratus*, *Himantalia elongate*, *Laminaria digitata*, *L. hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, y *Sargassum spp* (Sharma et al., 2013). De ellas, *Ascophyllum nodosum* es la más estudiada, se ha evaluado en una gran variedad de cultivos verificando su efecto elicitor y proveyendo resistencia frente a patógenos necrotrofos y biotrofos además de mostrar

impactos positivos en el desarrollo vegetal y rendimiento (Ali et al., 2016; Ramkissoon et al., 2017).

1.1.1 Principales componentes de los extractos de algas

Los componentes bioactivos de los extractos de algas marinas pueden ser: oligo y polisacáridos, lípidos, glicoproteínas, proteínas o péptidos los cuales son percibidos por las células vegetales y actúan a través de diferentes vías en la fisiología y metabolismo celular promoviendo diversos efectos benéficos para las plantas como se observa en la Figura 1-1 (Khan et al., 2009; Ramkissoon et al., 2017; Sharma et al., 2013).

Figura 1-1 Representación esquemática de efectos fisiológicos elicitados por algas marinas y posibles mecanismos de bioactividad.



Fuente: (Khan et al., 2009)

Entre los principales polisacáridos de la pared celular de las algas están la laminarina, el fucoidan, los alginatos y el manitol. La mayoría de los polisacáridos o derivados de estos tienen actividad fitoprotectora a nivel sistémico (Khan et al., 2009; Sharma et al., 2013). Los alginatos mejoran la aireación, la capilaridad, la retención de agua y en general la

estructura del suelo y su degradación favorece el crecimiento y desarrollo de micorrizas (Khan et al., 2009) y se considera que pueden inducir un estallido oxidativo en las plantas tratadas con extractos algales (Sharma et al., 2013).

Otros componentes bioactivos son los reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, citoquininas, betaínas, giberelinas, ácido abscísico, ácido jasmónico, poliaminas, etileno y brasinoesteroides (Sharma et al., 2013). Las auxinas son importantes en el proceso de enraizamiento, mientras que las citoquininas producen varios efectos como el control del ciclo celular, el desarrollo vascular, la movilización de nutrientes y el retraso de la senescencia (Khan et al., 2009; Ramkissoon et al., 2017; Sharma et al., 2013). Las citoquininas parecen estar implicadas también en la reducción de radicales libres confiriendo tolerancia al frío y la sal. Las betaines son moléculas que mejoran la respuesta vegetal al estrés osmótico inducido por salinidad, sequía y altas temperaturas y mejoran el contenido de clorofila aumentando el rendimiento de los cultivos (Khan et al., 2009; Sharma et al., 2013).

Otras moléculas por su parte presentan propiedades antimicrobianas como los ácidos grasos o regulan la permeabilidad de la membrana celular e influyen en la tolerancia a las bajas temperaturas en las plantas como los lípidos (Sharma et al., 2013).

Finalmente, proteínas, aminoácidos, lípidos y fragmentos de polisacáridos contenidos en los extractos algales corresponden a importantes recursos de elicitación de las defensas vegetales. Algunos de ellos pueden imitar las señales de los patógenos activando diferentes vías de señalización que desencadenan variados mecanismos de defensa a nivel local y sistémico (Khan et al., 2009; Ramkissoon et al., 2017; Walters et al., 2013).

1.1.2 Extractos de algas marinas y resistencia a enfermedades

El potencial de los extractos de algas marinas para la supresión parcial de un amplio espectro de enfermedades en plantas ha sido probado en varios cultivos con reducciones entre el 20 al 85% (Walters et al., 2013). La aplicación sobre plántulas de zanahoria afectadas por *Alternaria radicina* mostró una reducción significativa de la enfermedad (Jayaraj, Wan, Rahman, & Punja, 2008) mientras que la severidad de la infección

ocasionada por *Phytophthora capsici* fue reducida en un 80% en tomate (Panjehkeh & Abkhoo, 2016).

Algunos extractos muestran actividad inhibitoria directa sobre los microorganismos patógenos, como se observa con los extractos de *Ochtodes secundiramea* and *Laurencia dendroidea*, las cuales tienen fuerte efecto antifúngico directo sobre el hongo *Colletotrichum musae*, agente causal de la antracnosis en banano con una reducción del 89% y del 78%, respectivamente (Machado et al., 2014)

Los extractos de algas marinas se han aplicado en combinación con otras sustancias y alternados con fungicidas mostrando resultados satisfactorios. La aplicación de extractos de algas junto a tiamina permitió reducir el tizón temprano del tomate (Farouk, Safaa, & Abeer, 2012). Mientras que la aplicación alternada con fungicidas como Dalconex y Cupraneb resulta en la reducción de enfermedades importantes causadas por *Alternaria cucumerinum*, *Didymella applanata*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinérea*, *Alternaria solani*, *Xhantomonas campestris* en pepinos y tomate (Ali et al., 2016; Jayaraman, Norrie, & Punja, 2011). Por lo tanto, el uso en conjunto o alternado de extractos de algas con moléculas de origen sintético de protección o reguladores de crecimiento vegetal se muestra como una alternativa eficiente dentro de un programa integrado de manejo de enfermedades en los cultivos (Ali et al., 2016; Sharma et al., 2013).

Diversos estudios de bioinformática en plantas han demostrado la activación de cientos de genes cuando las plantas son tratadas con extractos de algas marinas (Jannin et al., 2013; Nair et al., 2012) y se ha encontrado que la inducción de moléculas señal como ácido jasmonico, salicílico y etileno desencadenan la activación de genes de defensa, proteínas relacionadas a proteínas de patogénesis (PR) y genes que participan en la síntesis de componentes inhibitorios como fenoles y fitoalexinas (Ali et al., 2016; Li et al., 2016).

Se ha sugerido en la reducción de enfermedades, que los extractos de algas marinas pueden actuar en la reparación acelerada de los tejidos dañados debido a que poseen sustancias como Auxinas, citoquininas y giberelinas que promueven el crecimiento vegetal (Ali et al., 2016; Craigie, 2011; Jayaraman et al., 2011).

Por otra parte, se considera que la aplicación de extractos de algas marinas puede también desencadenar un efecto priming sobre las plantas. Es decir, La promoción de una condición fisiológica en la cual la planta es capaz de mejorar o aumentar más rápidamente las respuestas de defensa, o ambas, frente a factores de estrés biótico o abiótico. El mecanismo molecular de este estado no se conoce con claridad, sin embargo, se ha sugerido que podría basarse en la acumulación o modificación postraduccional de una o más proteínas de señalización que, después de ser expresadas o modificadas, permanecen inactivas. Luego en un segundo evento de señalización se podría hiperactivar la proteína de señalización, desencadenando una transducción potenciada u otro mecanismo planteado es la acumulación de factores de transcripción cruciales que durante una fase secundaria podrían inducir directamente el conjunto de genes evitando la expresión preliminar del factor (Conrath et al., 2006).

1.2 Sistema inmune vegetal

La defensa vegetal recae en dos vías: inmunidad innata de las células individuales y una emisión de señales desde el sitio de infección. Inicialmente, la planta por medio de receptores de reconocimiento de patrones transmembrana (PRRs, por sus siglas en inglés) reconoce microorganismos de crecimiento lento, moléculas elicitoras y patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) que incluyen una amplia variedad de moléculas tales como: oligo y polisacáridos, péptidos, proteínas y lípidos muchos de los cuales hacen parte de estructuras conservadas evolutivamente y esenciales en la viabilidad de los patógenos como quitina y polisacáridos en hongos y flagelina en bacterias (Boller & He, 2009; Jones & Dangl, 2006; Khan et al., 2009; Koeck, Hardham, & Dodds, 2011; Ramkissoon et al., 2017; Wu, Shan, & He, 2014). Las plantas también generan señales durante la interacción denominadas patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) que actúan como señales de advertencia de infección o para amplificar la respuesta de defensa (Wu et al., 2014).

Esta primera vía en el sistema inmune vegetal es denominada Inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI, por sus siglas en inglés) y puede limitar o detener la colonización (Boller & He, 2009). Entre las respuestas asociadas a PTI están la alcalinización del medio, el flujo de iones a través de la membrana, la producción de ácido nítrico, ácido fosfatídico,

especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), etileno y la activación de una cascada de MAP quinasas evolutivamente conservada. (Wu et al., 2014).

Muchos patógenos sobrepasan esta primera línea de defensa por medio del despliegue de proteínas efectoras lo cual activa la segunda vía de defensa vegetal, llamada Inmunidad desencadenada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés) que le permite a la planta reconocer los efectores de patógenos de diversos reinos en forma directa a través de proteínas NB-LRR, que codifican para un "sitio de unión de nucleótidos" (NBS, del inglés "nucleotide binding site" y una "repetición rica en leucina" (LRR, del inglés "Leucine rich repeat"). Estas proteínas son codificadas por los genes de resistencia (genes R) o indirectamente por los efectos del efector en la planta. En ambos casos se desencadenan respuestas de defensa similares que involucran muerte celular localizada (respuesta hipersensible). La ETI es entonces una versión amplificada de la PTI que a menudo culmina en la inducción de hipersensibilidad. ETI es efectiva frente a patógenos cuyo estilo de vida sea biotrofo o hemibiotrofo debido a que necesitan de tejido vivo para realizar la infección (Jones & Dangl, 2006; Koeck et al., 2011).

1.2.1 Mecanismos de resistencia

Las plantas poseen barreras químicas y estructurales para limitar el ataque de los patógenos sin embargo estas estrategias son a menudo insuficientes para contener la infección por ello la planta recurre a las respuestas de defensa inducibles (Moosa, Farzand, Sahi, & Khan, 2017).

En primer lugar, se encuentra la resistencia basal activada por agentes patógenos en hospederos susceptibles que fue descrita anteriormente y corresponde a la respuesta PTI más una ETI débil, dada por un débil reconocimiento de los efectores (Jones & Dangl, 2006).

Resistencia sistémica adquirida (SAR, Por sus siglas en inglés) es una vía de transducción de señales dependiente del ácido salicílico que puede ser inducida por una gran variedad de moléculas procedentes de patógenos necróticos, algunos productos sintéticos como acibenzolar-s-metil (ASM) o la aplicación directa de AS exógeno (Pieterse & Van Loon, 1999; Walters et al., 2013). Por lo general, tiene un efecto de amplio espectro y larga

duración (Yasmin & Saleem, 2014). En tomate, la aplicación de AS exógeno por ejemplo, permitió mejorar la resistencia frente a Foc (Li et al., 2016).

Por otra parte, la resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) es activada por la colonización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal o heridas vegetales que desencadenan respuestas mediadas por vías sensibles al AJ y el etileno y cuya respuesta tiende a ser de amplio espectro y larga duración (Pieterse & Van Loon, 1999; Walters et al., 2013). Aunque también algunas rizobacterias pueden desencadenar SAR (Pieterse & Van Loon, 1999).

La inducción de resistencia SAR o ISR conduce a la activación directa de genes de defensa vegetal o al priming de las células vegetales, es decir, que estén listas para un subsecuente ataque de un patógeno. Se considera que la mayoría de las veces el efecto de inducción de resistencia está dado por una mezcla de ambos mecanismos (Walters et al., 2013).

1.2.2 Vías de defensa vegetal

Mediante la transducción de señales dadas por la percepción de moléculas elicitoras a través de redes integradas por diversas vías que involucran a su vez diferentes moléculas, las plantas pueden desencadenar respuestas de amplio espectro por la relación dada entre estas vías consiguiendo diferentes combinaciones de mecanismos de defensa (Pieterse & Van Loon, 1999).

Dentro de las moléculas involucradas en estas redes e inducidas por los patógenos para activar procesos de defensa se encuentran: moléculas señal de respuesta hipersensible como ácido salicílico (AS) y ácido jasmonico (AJ); fitohormonas reguladoras de crecimiento vegetal como ácido abscísico, ácido indol acético, citoquininas y giberelinas; Antioxidantes como glutatión y ácido ascórbico; componentes de defensa como polifenoles, ácidos fenólicos y flavonoides y los ácidos orgánicos, ácido siringico, ácido galácico y ácido sinápico (Li et al., 2016).

Las fitohormonas AS, AJ y etileno cumplen un rol crucial en la regulación del sistema de defensa vegetal con el fin de limitar el costo en fitness y ajustar la respuesta vegetal al tipo de microorganismo patógeno (De Coninck, Timmermans, Vos, Cammue, & Kazan, 2015). El ácido salicílico es una molécula clave de un conjunto de vías, las cuales son dependientes de su acumulación temprana a nivel local y sistémico. (Pieterse & Van Loon,

1999). Usualmente, las respuestas de defensa activadas por ácido salicílico son utilizadas en la resistencia frente a microorganismos biotrofos (Jones & Dangl, 2006) y comprenden la activación de los genes relacionados a patogénesis (PR, por sus siglas en inglés): PR1, PR2 y PR5 (Li et al., 2016).

El ácido jasmonico induce generalmente la expresión de los genes PR3, PR4 y PR12 (Li et al., 2016), sin embargo, sus derivados también pueden ejercer efecto en la expresión génica. Por ejemplo, el metil-jasmonato, un derivado del ácido jasmonico, aumenta la expresión del gen PR-1 previamente activado por ácido salicílico en tabaco, mientras que, la acción sinérgica de estas dos moléculas activan además los genes PR-5. Se ha demostrado que la activación del gen de defensa PDF1.2 de *Arabidopsis* requiere de la acción combinada de ácido jasmonico y etileno (Pieterse & Van Loon, 1999). Por consiguiente, algunos mecanismos de defensa vegetal son inducidos por el aumento simultáneo en los niveles de ambas moléculas siendo generalmente efectiva su vinculación en la promoción de la defensa frente a microorganismos necrotrofos (Jones & Dangl, 2006; Pieterse & Van Loon, 1999).

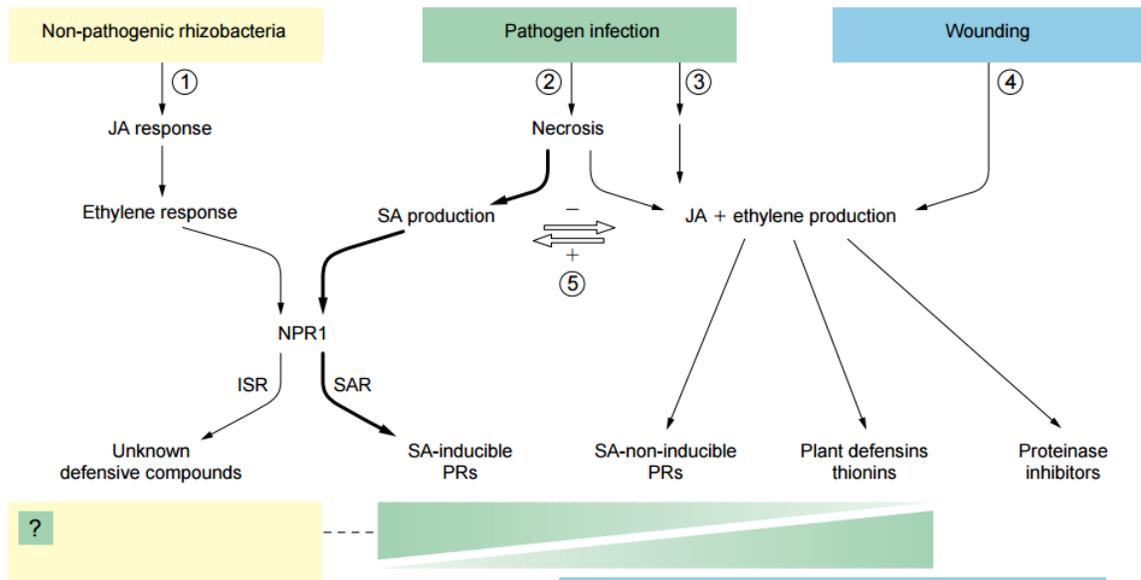
Se ha observado también interacción negativa entre las moléculas de señalización que conducen a la inactivación de respuestas de defensa. En Tabaco, el ácido salicílico y sus análogos funcionales el ácido 2,6-dicloro-isonicotínico y el benzothiadiazole pueden inhibir la expresión de genes de defensa inducidos por el ácido jasmonico. Mientras que, la presencia de este último junto al etileno mejoran las respuestas inducidas por el ácido salicílico (Pieterse & Van Loon, 1999).

Todas las moléculas involucradas en los procesos de defensa inducen la activación de genes relacionados a patogénesis (PR) (Li et al., 2016) y la expresión de los mismos puede ser mediado por diferentes vías de señalización (Pieterse & Van Loon, 1999) como se observa en el caso del gen PR-1, que tradicionalmente se considera un gen marcador de las vías dependientes de ácido salicílico (Li et al., 2016; Pieterse & Van Loon, 1999) pero en tabaco puede ser inducido también por ácido poliacrílico.

En *Arabidopsis* el gen PR1 es activado en respuesta al etileno y al (AJ) a través de inducción por rizobacterias o heridas, mientras que en condiciones de estrés biótico la activación es mediada por la acumulación de (AS). En frutos de banano, el gen MaPR1a puede ser activado tanto por etileno, como por ácido jasmonico y ácido salicílico (Kesari,

Trivedi, & Nath, 2010). A pesar de compartir pasos de señalización la transducción de señales por SAR e ISR no son idénticos y por lo tanto los mecanismos de defensa desencadenados son diferentes con la activación de grupos de genes de defensa distintos en cada uno de los casos como se observa en la Figura 1-2 (Pieterse & Van Loon, 1999).

Figura 1-2 Rutas de señalización sistémicas inducidas en plantas por rizobacterias, patógenos o heridas



Fuente: (Pieterse & Van Loon, 1999)

1.2.3 Defensa vegetal en banano

En el banano, la defensa vegetal depende en gran parte de la proporción y de la cantidad de compuestos fenólicos producidos de la síntesis de lignina que permite además fortalecer la estructura de la pared (Li et al., 2016). Es importante recalcar el efecto del genotipo del hospedero en el nivel de resistencia, para el caso del banano, se ha evidenciado una relación entre las respuestas de defensa activadas en cultivares y el nivel de ploidía. En el estudio realizado por Torres et al., 2012 el cultivar Calcutta 4 (*Musa acuminata* ssp. *burmanicoides*) diploide (AA) evidenció un mayor nivel de resistencia al patógeno *P. fijiensis* que el cultivar Williams triploide (AAA) a través de la inducción

diferencial de genes de defensa que codifican para enzimas como Fenilalanina amonoliasa (PAL, por sus siglas en inglés), peroxidasa (POX, por sus siglas en inglés), y b-1,3-glucanasa en las primeras 72 horas de infección (Torres et al., 2012). Otros cultivares de banano susceptibles a Sigatoka negra, 'Gran Enano' (AAA), 'Barraganete' (AAB) y 'Dominico' (AAB) presentan igual nivel de ploidia al cultivar Williams (Sánchez Timm, Hidalgo Pardo, & Pacheco Coello, 2016) los cuales hacen parte de las 20 variedades de banano de las 300 especies que existen que son cultivables con fines comerciales (Yasmin & Saleem, 2014).

Los cultivares de banano catalogados como resistentes a enfermedades importantes, como la Sigatoka negra y el mal de panamá, presentan incrementos en la actividad y el nivel de expresión de genes de defensa en una fase temprana de la interacción con el patógeno que los cultivares susceptibles desencadenando muerte celular en las zonas de infección evitando la dispersión del patógeno (Sánchez Timm et al., 2016).

El cultivar Calcuta 4 resistente al patógeno *P. fijiensis* incrementa la expresión de los genes que codifican para las proteínas relacionadas a proteínas de patogénesis (PR) PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-9, PR-10, PR-14 y PR-15 durante la interacción con el patógeno (Portal et al. 2011; Rodríguez-Cabal 2012). Mientras que en *M. yunnanensis* (YN) resistente a Foc RT4, se observó el aumento en la expresión de los genes codificantes de las proteínas PR-1, PR-2, PR-4, PR-5, PR-9 y PR-12 durante la interacción (Li et al., 2016).

El tiempo de reconocimiento del patógeno condiciona el éxito de la defensa vegetal, mediada, por un incremento rápido de las fitohormonas y moléculas señal durante la interacción (Yasmin & Saleem, 2014). Las moléculas activadas, el nivel de activación y el tiempo en el que son activadas dependen de la interacción dada, es decir del patógeno causal de enfermedad y del genotipo del hospedero como se mencionó anteriormente. Por tanto, la respuesta de defensa no es igual entre cultivares en tiempo de respuesta y moléculas activadas y un mismo cultivar puede o no activar los mismos mecanismos frente a patógenos diferentes.

Plantas de banano YN resistentes a Foc aumentan las moléculas señal ácido salicílico, metil-jasmonato, ácido indol acético y disminuyen las moléculas ácido abscísico, citoquininas y ácido giberelico desencadenando así los diferentes mecanismos de defensa.

Por el contrario, las plantas de banano Cavendish BX variedad susceptible a Foc disminuyen el nivel de ácido jasmonico, ácido indol acetico y aumentan el nivel de metil-jasmonato, ácido abscísico, citoquininas y ácido giberelico (Li et al., 2016).

1.3 RT-qPCR

1.3.1 Características de la RT-qPCR

La qRT-PCR es una herramienta de biología molecular que permite determinar en qué medida un gen está siendo expresado en un momento determinado, por medio de la amplificación del cDNA obtenido por la transcripción reversa del mRNA aislado (Pfaffl, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). Es una técnica altamente sensible que permite la cuantificación de transcritos poco frecuentes y con pequeños cambios en la expresión génica. Además de proveer exactitud confianza y rapidez en la cuantificación de los datos (Pfaffl, 2001).

La cuantificación de la expresión génica ha sido necesaria para hacer estudios desde diversos enfoques. Por ejemplo: Validar el nivel de proteínas, validar el grado de transcripción de un gen, estudiar la expresión diferencial de genes en patosistemas, cambios en la expresión génica debido a crecimiento y desarrollo, cambio en la expresión génica de células expuestas a algún producto químico, validar la efectividad de RNA no interferente o antisentido y como herramienta de diagnóstico (Schmittgen & Livak, 2008).

Hay dos formas para cuantificar los datos obtenidos por medio de qRT-PCR. La cuantificación absoluta y la relativa, cada una de ellas tiene modelos que permiten obtener el nivel de expresión génica. La cuantificación absoluta permite determinar el número de copias del transcrito con base a una curva de calibración. La cuantificación relativa está basada en la expresión de un gen blanco versus uno de referencia (control endógeno), lo cual permite establecer los cambios fisiológicos en la expresión génica (Pfaffl, 2001; Schmittgen & Livak, 2008).

Los genes de referencia o también llamados Housekeeping están presentes en todos los tipos de células nucleadas, su expresión se considera estable en condiciones normales y

de experimentación ya que su expresión está asociada a funciones básicas en la célula como la supervivencia (Pfaffl, 2001). Entre los comúnmente utilizados se encuentran β -actina, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, fosforibosil-transferasa y 18S del ARN ribosomal.

El Cp/Ct es definido como el ciclo de la PCR en el cual la señal de fluorescencia del fluoróforo alcanza el umbral definido arbitrariamente en la reacción (Pfaffl, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). El valor numérico del Cp/Ct está inversamente relacionado con la cantidad de DNA blanco en la reacción, es decir que entre menor sea el valor Ct, mayor cantidad de DNA blanco (Schmittgen & Livak, 2008).

Los datos de Ct obtenidos a partir de las reacciones de PCR en tiempo real pueden analizarse utilizando varios modelos matemáticos para la cuantificación relativa, en la cual los valores obtenidos en cada tratamiento o condición son normalizados con un control de referencia o Housekeeping.

En esta investigación se empleará el método comparativo del Ct (Livak & Schmittgen, 2001) que tiene como asunción una eficiencia de 100% de la reacción. Este modelo matemático contiene dos variantes que permiten analizar los datos desde dos enfoques diferentes: La fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que permite definir el nivel de expresión de un tratamiento en relación al control y la variante $2^{-\Delta Ct}$ que permite definir la cantidad de transcrito expresada y hacer comparaciones entre tratamientos (Schmittgen & Livak, 2008).

1.4 Hipótesis

Ho: La aplicación de un extracto a base de algas marinas (*A. nodosum*) sobre plántulas de banano no tiene efecto en el nivel de expresión de genes involucrados en respuestas de defensa vegetal.

Ha: La aplicación de un extracto a base de algas marinas (*A. nodosum*) sobre plántulas de banano tiene efecto en el nivel de expresión de genes involucrados en respuestas de defensa vegetal.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Analizar el nivel de expresión de cuatro genes asociados a defensa vegetal en plántulas de banano tratadas con diferentes concentraciones de un extracto de algas marinas

1.5.2 Objetivos específicos

- Identificar en el genoma del Banano (*Musa* sp) cuatro genes marcadores de rutas de defensa.
- Obtener el nivel de expresión de los cuatro genes seleccionados en plántulas sometidas a diferentes concentraciones de un extracto de algas marinas.
- Analizar el efecto del extracto de algas marinas sobre la expresión de los genes estudiados.

2. Diseño Metodológico

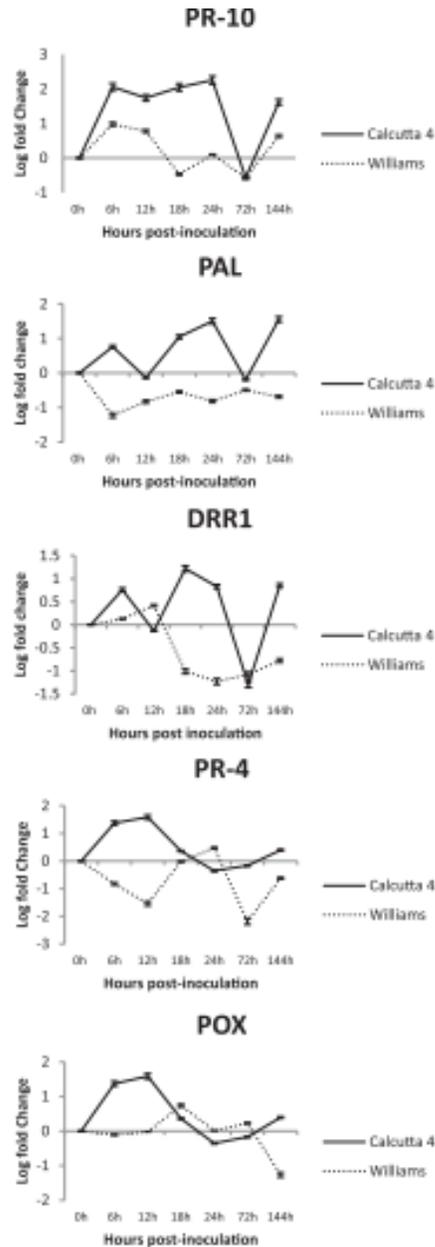
2.1 Identificación y validación de la amplificación en el genoma del Banano (*Musa* sp) de genes marcadores de rutas de defensa

2.1.1 Identificación de genes marcadores de rutas de defensa

La respuesta de defensa vegetal está marcada por la activación de diversas rutas que involucran diferentes moléculas y desencadenan variadas combinaciones de mecanismos de defensa que implican la síntesis de proteínas las cuales en gran parte son transversales a varios patosistemas, dentro de ellas se encuentran: Fenilalanina amonio liasa (PAL), β -1,3-glucanasa, quitinasa y peroxidasa las cuales son inducidas por el ataque de patógenos (Torres et al., 2012).

Investigaciones previas, realizadas en la Unidad de Biotecnología Vegetal Unalmed-CIB identificaron un grupo de genes de defensa expresados diferencialmente en plantas de banano de las variedades Calcuta y Williams para determinar los genes asociados a defensa vegetal que son activados durante a interacción con *P. fijiensis*, uno de los principales patógenos que afectan este cultivo a nivel mundial (Rodríguez, Rodríguez-Arango, Morales, Kema, & Arango, R, 2016). Los genes peroxidasa, proteínas relacionadas con la patogénesis PR-4, PR-10, fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y la proteína de respuesta de resistencia a la enfermedad (Disease resistance response, (DRR)-1), mostraron un nivel de expresión diferencial entre plantas de la variedad Calcutta 4 (Variedad resistente) y Williams (Variedad susceptible) después de la infección con el hongo (Ver Figura 2-1).

Figura 2-1 Genes expresados diferencialmente en Banano (*Musa sp*)



Fuente: (Rodriguez et al., 2016)

Las plantas pueden desencadenar respuestas de defensa de amplio espectro por la relación entre diversas vías de señalización celular que involucran diversas moléculas inducidas por los patógenos, organismos no patógenos o heridas para activar procesos de defensa, entre estas moléculas de señalización se encuentran el ácido salicílico (AS) y ácido jasmonico (AJ).

El gen PR4 es un gen marcador de rutas de defensa ya que se encuentra asociado a la acumulación de ácido jasmonico (Li et al., 2016). La actividad de los genes POX y PAL también se encuentra relacionada a la acumulación de esta molécula señal por ello estos tres genes fueron tomados como candidatos para el desarrollo de la presente investigación ya que se observa que estos presentan niveles de expresión más bajos en la variedad susceptible Williams en el trabajo de Rodriguez et al., 2016 y se quiere establecer si estos genes que participan en la defensa pueden ser elicitados en la variedad susceptible mediante el uso de un extracto de algas marinas a base de *Ascophyllum nodosum*. En la investigación se incluye dentro de los genes candidatos el gen PR1 debido a que está asociado a la acumulación de ácido salicílico y se desea observar si existe elicitación derivada de la acumulación de esta molécula señal.

Fenilalanina Amonio Liasa - PAL

PAL es una enzima que se encuentra en plantas angiospermas. Esta enzima participa en la vía de los Fenilpropanoides controlando la entrada de L-fenilalanina en la ruta, lo cual conlleva a la síntesis de numerosos metabolitos tales como cumarinas, ligninas, flavonoides (incluyendo antocianinas) y componentes fenólicos los cuales pueden ser precursores de otras rutas como la biosíntesis de lignina o actuar como fitoalexinas antimicrobianas (Rodriguez et al., 2016; Torres et al., 2012).

Los compuestos fenólicos sintetizados a través de esta ruta tienen estructuras químicas y funciones biológicas diversas incluyendo roles como pigmentos de flores, frutos, filtros de radiación UV-B y componentes de la pared celular. La sobreexpresión de este gen se ha relacionado con la acumulación de lignina y engrosamiento de la pared celular (Rodriguez et al., 2016). Estudios han demostrado que la producción de componentes fenólicos del tipo fenilfenalenonas en cultivares de banano pueden tener actividad directa contra patógenos como *P. fijiensis* y parecen estar relacionadas con la resistencia exhibida por el cultivar Yangambí Km 5 frente al mismo patógeno (Rodriguez Cabal, 2009; Torres et al., 2012). En condiciones de estrés biótico la actividad enzimática de PAL aumenta considerablemente en el área de infección con lo cual se presume que esta enzima puede responder a la presencia de elicitors biológicos.

Proteínas relacionadas con proteínas de Patogénesis PR1-PR4

En los procesos de infección la aparición de síntomas está ligada a la aparición de una o más proteínas nuevas. Estas proteínas de origen vegetal han sido identificadas en plantas de diversas especies y son inducidas bajo condiciones específicas de estrés biótico por microorganismos o insectos, heridas, condiciones ambientales adversas y exposición a productos químicos que actúan de forma similar a los patógenos (Kesari et al., 2010; Sinha et al., 2014).

Las proteínas PR son proteínas de bajo peso molecular en un rango de 6 a 43 kDa, estables a pH <3 y resistentes a las proteasas, características bioquímicas que les permite funcionar en ambientes hostiles como el compartimento vacuolar, la pared celular y los espacios intercelulares (Sinha et al., 2014). La función de las proteínas PR es proteger la planta del daño excesivo mediante la inhibición directa del crecimiento y la activación de la resistencia inducida adquirida (SAR) por tanto su expresión está directamente correlacionada con la activación de este mecanismo de resistencia (Moosa et al., 2017). Sin embargo, algunas proteínas PR son activadas durante el crecimiento y desarrollo vegetal en fases como la floración, la senescencia y la maduración de los frutos (Kesari et al., 2010).

Tabla 2-1 Clasificación proteínas PR

Family	Size (kDa)	Member	Properties
PR-1*	15	Tobacco (PR-1a)	Antifungal
PR-2	30	Tobacco (PR-2)	β -1,3-glucanases
PR-3	25–30	Tobacco P, Q	Chitinases (I, II, IV, V, VI, VII)
PR-4	15–20	Tobacco R	Chitinases (I, II)
PR-5	25	Tobacco S	Thaumatin-like proteins (TLPs)
PR-6	8	Tomato inhibitor I	Proteinase inhibitor
PR-7	75	Tomato P ₆₉	Endoproteinase
PR-8	28	Cucumber chitinase	Chitinase (III)
PR-9	35	Tobacco (lignin-forming peroxidase)	Peroxidase
PR-10	17	Parsley (PR-1)	Ribonuclease-like proteins (RLP)
PR-11	40	Tobacco class-V chitinase	Chitinase (I)
PR-12	5	Radish RsAFP3	Defensin
PR-13	5	<i>Arabidopsis</i> Thi2.1	Thionin
PR-14	9	Barley LTP4	Lipid-transfer protein (LTP)
PR-15	20	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase (OXO)
PR-16	20	Barley OxOLP	Oxalate oxidase-like (OXO)
PR-17	27	Tobacco PRp27	Antiviral and antifungal

*PR, pathogenesis-related.

Fuente: (Moosa et al., 2017)

Las primeras evidencias de estas proteínas se observaron en la interacción Tabaco-Virus del mosaico del tabaco y a partir de allí fueron identificadas en diferentes especies

vegetales. Actualmente, las proteínas PR comprenden 17 familias PR1-PR17 clasificadas con base a sus características serológicas, actividades bioquímicas y biológicas y su secuencia de aminoácidos (Kesari et al., 2010; Moosa et al., 2017; Sinha et al., 2014; Yasmin & Saleem, 2014). 13 familias exhiben actividad antifúngica PR-1–PR-5, PR-8, PR-11–PR-16, los roles principales de cada familia se pueden observar en la tabla 2-1.

Dentro de los genes PR la única familia para la cual la función no es del todo clara, consiste en las proteínas PR-1. Miembros específicos de las familias de tabaco y tomate PR-1 tienen actividad antifúngica contra hongos y oomicetos, pero su mecanismo de acción no es conocido. El gen PR-1 se considera un marcador clave de rutas de defensa activadas por la acumulación de AS (Ali et al., 2016).

Las proteínas de la familia PR4 codifican para quitinasas y cumplen un rol antifúngico directo mediante la degradación de quitina deteniendo el crecimiento hifal e indirecto, debido a los oligosacáridos de quitina liberados por la pared celular del patógeno actúan como elicitores y pueden inducir otro rango amplio de respuestas de defensa vegetal (Moosa et al., 2017; Torres et al., 2012). El gen PR-4 parece estar relacionado con altos niveles de AJ en plántulas de banano como se observa en la variedad YN infectada por Foc RT4 (Li et al., 2016).

Peroxidasa-POX

Seguido al reconocimiento del patógeno, la planta exhibe una explosión oxidativa con la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos despliegan efectos tóxicos directos sobre el patógeno o indirectos a través de la participación en los procesos de reforzamiento por la aposición de sustancias adicionales en la pared celular (De Coninck et al., 2015). Estas sustancias reducen la susceptibilidad de la pared a la degradación física actuando como barrera mecánica y la degradación enzimática, además de restringir la difusión de toxinas del patógeno.

Algunas de las sustancias que se acumulan pueden ser callosa, lignina, poliaminas fenólicas, proteínas estructurales como glicoproteínas y polímeros como pectina (De Coninck et al., 2015). Las peroxidasas se encuentran activas durante el proceso de síntesis

de lignina y cumplen un rol importante en la polimerización dependiente de peróxido de hidrógeno de alcoholes hidroxicinámicos (Torres et al., 2012) y reducen los niveles de ROS por la metabolización de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, las peroxidasas participan en otros procesos a lo largo del ciclo vital de la planta como el crecimiento, el catabolismo de auxina y la defensa frente al estrés oxidativo.

En estudios realizados *in vitro*, las peroxidasas también han demostrado la capacidad de realizar reacciones de oxidación para generar H_2O_2 ; tal es el caso de la oxidación de ácido indol acético, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, por siglas en inglés de la forma reducida de la molécula), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH, por siglas en inglés de la forma reducida de la molécula) ciertos fenoles y tioles.

2.1.2 Validación de genes marcadores de rutas de defensa

2.1.2.1 Extracción de ARN

Tejido vegetal de Plántulas de Banano variedad Williams, fue sometido al tratamiento de extracción utilizando PureLink® Plant RNA Reagent (Control & Products, 2005) para extraer el RNA total de las muestras.

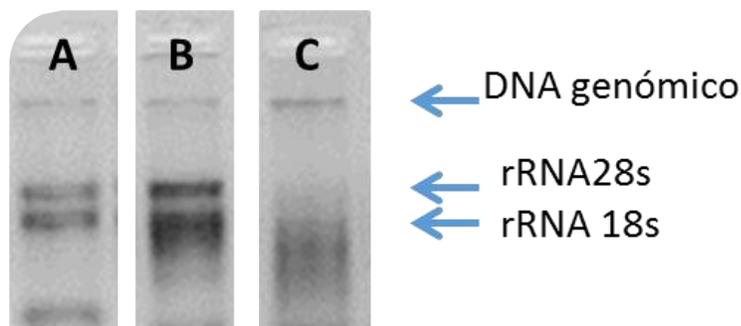
2.1.2.2 Evaluación de la calidad y cantidad del ARN

La concentración del ARN se verificó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm (A260), considerando que una unidad de A260 equivale a 40µg/ml de ARN y la pureza mediante el cociente A260/ A280, cuyo valor aproximadamente a 2.0 y el cociente A260/ A230 cuyo valor en el rango 1.8-2.2 indican una muestra de ARN pura (ThermoFisher, 2000). Para ello se usó un NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA).

La calidad se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% usando el intercalante GelRED™ (Biotium, USA) (2 µg/ml) y visualizando mediante luz Ultravioleta. Las muestras con buena calidad eran las que evidenciaban bandas nítidas para el RNA ribosomal 28S y 18S (Fleige & Pfaffl, 2006).

Figura 2-2 Calidad del RNA

A. RNA integro B. RNA levemente degradado C. RNA degradado

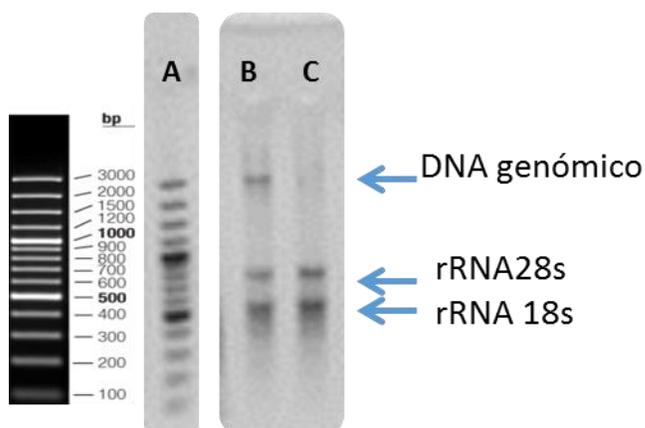
**2.1.2.3 Digestión**

Se empleó el kit DNase I® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) para tratar 1000 ng de ARN y remover el ADN genómico contaminante de acuerdo con instrucciones del fabricante. La calidad y concentración fue nuevamente verificado por el uso del NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA) y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% usando el intercalante GelRED™ (Biotium, USA) (2 µg/ml) y visualizando mediante luz Ultravioleta.

Figura 2-3 Digestión

A. Marcador de peso molecular (Generuler 100pb Plus DNA ladder, Thermo Scientific)

B. RNA sin digerir C. RNA digerido



2.1.2.4 Síntesis de cDNA

El cDNA fue sintetizado a partir de 280ng usando el kit para RT-PCR Maxime first strand cDNA synthesis® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) de acuerdo con instrucciones del fabricante.

2.1.2.5 PCR convencional

El cDNA sintetizado se empleó para realizar PCR convencionales para validar si la concentración del cDNA (280ng) y la temperatura de alineamiento (60°C) son adecuados para la amplificación de los genes candidatos usando cebadores que amplifican un fragmento de aproximadamente 150pb que fueron diseñados previamente en la Unidad de Biotecnología vegetal Unalmed-CIB (Rodríguez et al., 2016).

El perfil térmico para esta PCR fue estandarizado con una temperatura de desnaturalización de 95°C durante 1 min seguido de una fase de 35 ciclos a 95°C durante 30s, 60°C durante 20s y 72°C durante 30s y una extensión final de 5 min. En el proceso se utilizaron los reactivos comerciales de la marca Thermo Scientific para un volumen final de reacción de 10 µl así 1 µl de buffer 10x, 0.3 µl de MgCl₂, 0.2 de Primers, 0.2 de dNTPs, 0.125 µl de Taq polimerasa y 1 µl de RNA.

2.2 Obtención del nivel de expresión de los cuatro genes seleccionados en plántulas sometidas a diferentes concentraciones del extracto.

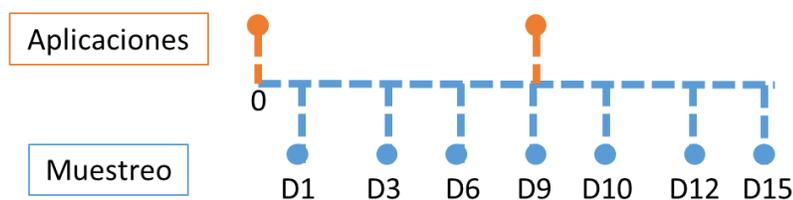
2.2.1 Diseño Experimental

Estudios previos realizados por Torres y colaboradores (2012) demostraron que la inducción de enzimas asociadas a defensa vegetal como POX y PAL en plantas de banano variedad Williams se presentaba pasados seis días después de la infección por el hongo patógeno *P. fijiensis* mientras que la variedad resistente Calcuta 4 mostraba inducción pasadas tres días después de la infección. Esta respuesta diferencial entre cultivares permite establecer el éxito en la defensa vegetal consistente en la rápida inducción y respuesta de las proteínas asociadas a defensa. En este ensayo se determinó un rango

de análisis de 15 días con una primera aplicación del extracto de algas marinas comercial a base de *Ascophillum nodosum* el día cero y una segunda aplicación el día nueve. Rango de análisis que es similar al observado en el mencionado estudio para hacer un contraste del efecto causado por el extracto de algas en relación a las respuestas fisiológicas en condiciones normales y de estrés biológico observadas en el estudio de Torres y colaboradores (2012)

La expresión génica de los genes asociados a defensa vegetal en plántulas de Williams fue verificada bajo la acción de cuatro concentraciones 0 cc/ha, 500 cc/ha, 1000 cc/ha y 2000 cc/ha, las cuales reflejan las concentraciones de uso comercial del producto evaluado.

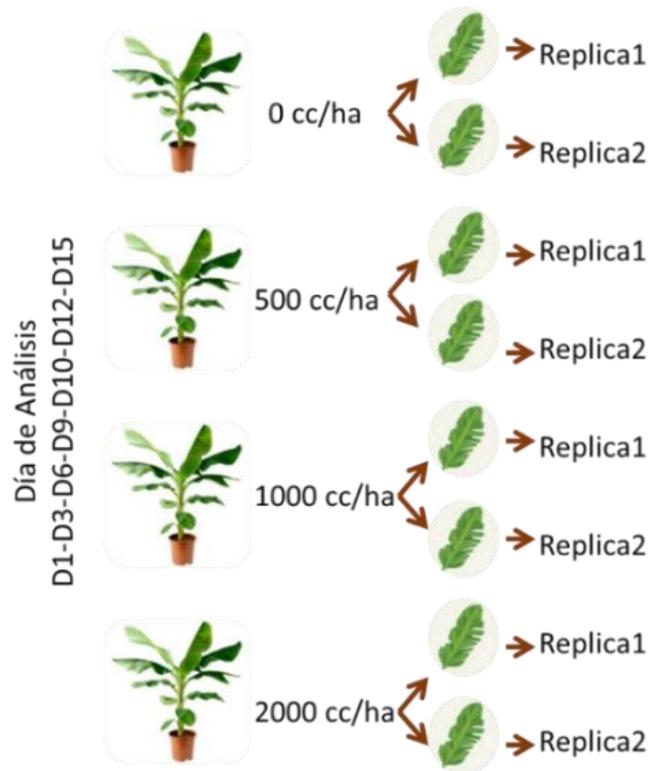
Figura 2-4 Diseño metodológico, aplicaciones y muestreo



En la parte superior de la Figura 2-4, dos aplicaciones del extracto en los días cero y nueve, marcados por los círculos naranja y en la parte inferior marcados por círculos azules los días designados para toma de muestras.

Las muestras se tomaron en el transcurso de dos semanas, se seleccionaron los días: D1, D3, D6, D9, D12 Y D15 como se observa en la Figura 2-4. En estudios previos se ha observado que la respuesta de defensa vegetal frente a inductores o patógenos como *P. Fijjensis* se da entre este periodo de tiempo. En el caso de fitopatógenos las variedades resistentes responden rápidamente a la infección entre las 24h y 72h, mientras que las variedades susceptibles la respuesta es un poco más tardía. En relación con los inductores se desea establecer si el producto tiene un efecto temprano o si es necesario reforzar la aplicación para obtener una respuesta en la activación de genes de defensa.

Para cada uno de los días establecidos de análisis se emplearon cuatro plantas, una para cada concentración a evaluar. En cada planta se aplicó el producto en dos hojas, cada una de las cuales correspondió a una réplica biológica como se observa en la Figura 2-5.

Figura 2-5 Diseño metodológico por día de análisis.

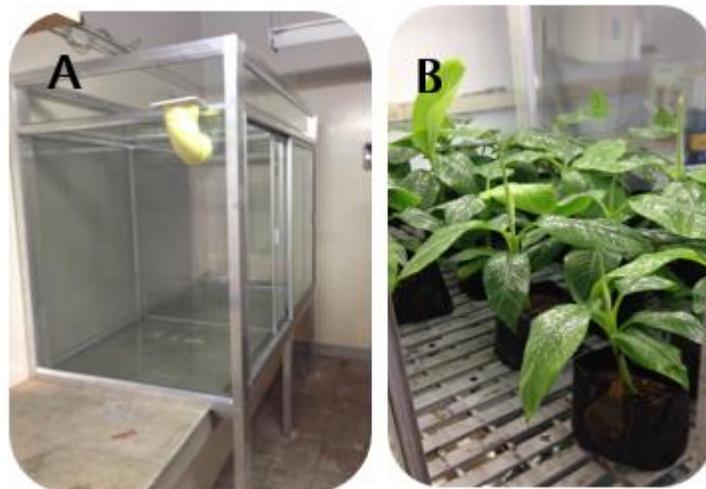
En cada día de análisis, se utilizaron cuatro plantas de banano (Var: Williams) una por cada concentración analizada (0, 500, 1000 y 2000 cc/ha) de las cuales se tomaron dos muestras foliares como réplicas biológicas.

2.2.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas de Banano de la variedad susceptible Williams (Triploide, Grupo genómico AAA) procedentes de la Universidad Católica del Oriente y obtenidas por cultivo *in vitro*. Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero con fertilización con triple 15 y urea e irrigación diaria hasta que las plántulas tuvieran tres meses. Pasado este tiempo, las plántulas se aclimataron durante dos semanas en cámara de infección bajo las siguientes condiciones: 29°C, humedad relativa del 95% y fertilización estándar.

Figura 2-6 Material vegetal

A Cámara de infección B. Plántulas de Banano variedad Williams 3 meses.



2.2.3 Toma de muestra

Las suspensiones del producto a las concentraciones a evaluar: 500, 1000 y 2000 cc/ha y agua destilada para la concentración 0cc/ha se aplicaron mediante aspersion sobre el haz y el envés de la hoja utilizando una bomba fumigadora manual. Las hojas fueron recolectadas de acuerdo a los días seleccionados de muestreo, envolviéndolas en papel aluminio y sumergiéndolas en Nitrógeno Líquido inmediatamente para ser almacenadas a -80°C hasta su utilización.

2.2.4 Procesamiento de las muestras

El tejido vegetal previamente recolectado y conservado a -80°C , fue sometido al tratamiento de extracción utilizando PureLink® Plant RNA Reagent (Control & Products, 2005) para extraer el RNA total de las muestras.

La concentración del ARN se verificó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm (A260), considerando que una unidad de A260 equivale a $40\mu\text{g/ml}$ de ARN y la pureza mediante el cociente $A260/A280$, cuyo valor aproximadamente a 2.0 y el cociente $A260/A230$ cuyo valor en el rango 1.8-2.2 indican una muestra de ARN pura (Thermofisher,

2000). Para ello se usó un NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA).

La calidad se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% usando el intercalante GelRED™ (Biotium, USA) (2 µg/ml) y visualizando mediante luz Ultravioleta. Las muestras con buena calidad eran las que evidenciaban bandas nítidas para el RNA ribosomal 28S y 18S (Fleige & Pfaffl, 2006).

Se empleó el kit DNase I® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) para tratar 1000 ng de ARN y remover el ADN genómico contaminante de acuerdo con instrucciones del fabricante. La calidad y concentración fue nuevamente verificado por el uso del NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA) y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% usando el intercalante GelRED™ (Biotium, USA) (2 µg/ml) y visualizando mediante luz Ultravioleta.

Finalmente, el cDNA fue sintetizado a partir de 280ng usando el kit para RT-PCR Maxime first strand cDNA synthesis® (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) de acuerdo con instrucciones del fabricante.

2.2.5 PCR en tiempo real

El nivel de expresión de los genes asociados a defensa vegetal fue determinado por RT-PCR cuantitativa basada en fluorescencia, normalizando los niveles de expresión con el gen de referencia. En la tabla 2-2 se detalla la secuencia de los cebadores utilizados en el presente estudio.

Tabla 2-2 Secuencia de los Primers utilizados para qRT-PCR

Gen	ID-Primer	Tipo	Secuencia
Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	PAL_fw	Defensa	5'-TGCTGTCGGCGGTCTTTTGC-3'
	PAL_rv		5'-TGCTGTCGGCGGTCTTTTGC-3'
Pathogenesis-Related Protein 1 (PR1)	PR_1_fw	Defensa	5'-CGCTTCGGCTTTGGTGTGTG-3'
	PR_1_rv		5'-CGCTCGTTGGCGTAGTTCTG -3'
Pathogenesis-Related Protein 4 (PR4)	PR_4_fw	Defensa	5'-TGGGACGCCAATAAGCCCCT-3'
	PR_4_rv		5'-TCCTGACCGTAGCCTGAGTTCC-3'
Peroxidase (POX)	POX_fw	Defensa	5'-AAGTCCACCTGCCCAACG-3'
	POX_rv		5'-GCCTGCCGACCCATCCAACA-3'
	Gadp_fw	Housekeeping	5'-TAGCAAGGACTGGAGAGGCG-3'

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH)	Gadp_rv		5'GTCGGAACACGGAAAGACATAC C-3'
--	---------	--	----------------------------------

El cDNA sintetizado se empleó para realizar la qPCR usando el Kit Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante en un termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Foster CytI, CA, USA).

Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 95°C por 30 segundos (s) alineamiento a 60°C por 20s, elongación a 72°C por 30s por 35 ciclos de amplificación con una medida de fluorescencia única. La curva melting permite evaluar la formación de un producto único verificando la especificidad de la reacción o la formación de dímeros de cebadores además del producto de interés realizándola a (50-95°C) con una tasa de calentamiento de 0.5°C por segundo y una medida continua de fluorescencia. Para cada muestra se analizaron dos repeticiones biológicas independientes con tres replicas técnicas y dos controles negativos por primer y plato de montaje.

2.2.6 Análisis de la expresión génica relativa

Las diferencias en la expresión de cada uno de los genes relacionados con defensa vegetal a las diferentes concentraciones del extracto de algas marinas, se calculó usando el método comparativo del Ct ($2^{\Delta\Delta Ct}$) asumiendo una eficiencia del 100% en la reacción (Livak & Schmittgen, 2001)

2.2.6.1 Cuantificación relativa normalizada

Los valores obtenidos para cada uno de los genes blanco en condición de tratamiento son normalizados con los niveles de Ct del gen en condiciones control, para lo cual se empleó la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los valores de Ct obtenidos tanto para el gen blanco en tratamiento como para el gen blanco control son corregidos con el Ct de la expresión del gen de referencia.

En la cual: $\Delta Ct = (Ct \text{ del Gen blanco} - Ct \text{ del gen de referencia})$

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ del gen blanco} - \Delta Ct \text{ control})$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$: Incremento en la expresión del gen blanco respecto al control

2.2.6.2 Cuantificación $2^{-\Delta Ct}$

Es una derivación del método anterior en la cual se elimina la expresión del gen bajo condiciones de control y así se puede ver la magnitud en la expresión del gen, la cual es proporcional a la cantidad de transcrito. Por lo cual se puede comparar la expresión del gen blanco bajo diferentes condiciones de tratamiento (Schmittgen & Livak, 2008).

$2^{-\Delta Ct}$: Cantidad relativa del gen de interés

2.3 Análisis estadísticos

Se comparó de forma independiente los valores de expresión en los tratamientos: 0, 500, 1000 y 2000 cc/ha en cada día y replica por gen mediante la prueba ANOVA identificando si se presentaban diferencias significativas entre ellos. se consideró un $p < 0.003$ estadísticamente significativo con el Ajuste de Bonferroni sobre el nivel de significancia. Seguido a esto, se realizó una prueba Tukey para determinar cuáles tratamientos presentaban mencionadas diferencias y se aplicó el test Shapiro Wilk para verificar la normalidad en todos los modelos considerando un $p < 0.01$ estadísticamente significativo. Los datos fueron analizados con el paquete estadístico R Core Team (2017).

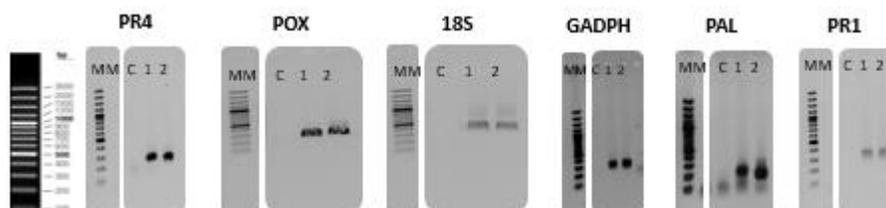
3. Resultados

3.1 Identificación y validación de la amplificación en el genoma del Banano (*Musa sp*) de genes marcadores de rutas de defensa

Se verificó mediante PCR convencional si la concentración del cDNA (280ng) y temperatura de alineamiento (60°C) eran adecuadas para la amplificación de los cuatro genes seleccionados para la presente investigación PR4, PAL, POX y PR1.

Figura 3-1 PCR Convencional.

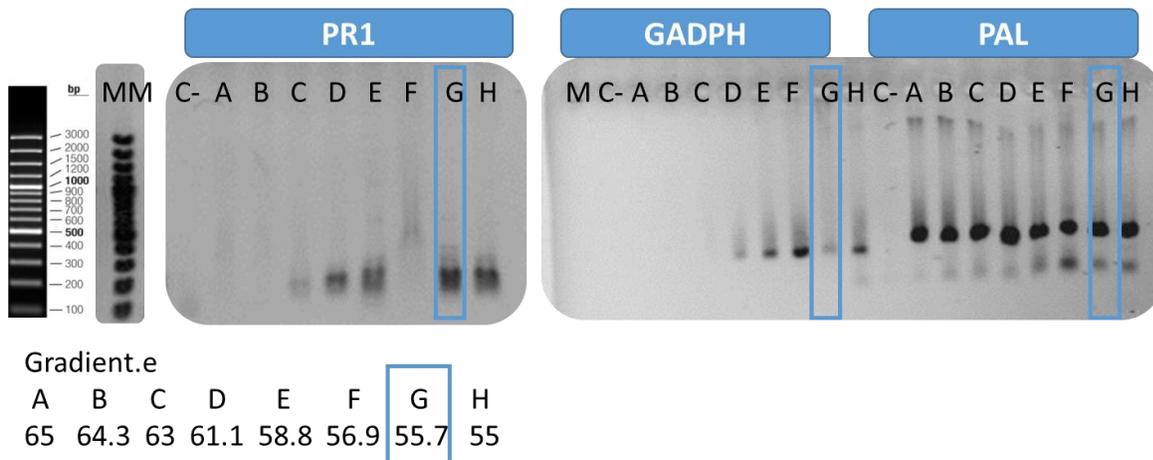
MM Generuler 100pb plus DNA Ladder. C. Muestra Negativa sin cDNA; 1 y 2 muestras con cDNA 280gn



De acuerdo a la Figura 3-1, se observa que los genes PR-4, POX y PAL amplificaron muy bien a la concentración y temperatura evaluadas a excepción de PR-1 y el 18S, los cuales mostraron bandas muy tenues. Como genes de referencia se analizaron el 18S y el GADPH de los cuales se seleccionó el gen GADPH ya que mostró mejor amplificación bajo las condiciones del experimento.

Se realizó un gradiente para establecer otra temperatura que permitiera una mejor amplificación del gen PR1 que mostró bandas tenues (Figura 3-1). El gradiente se realizó también para el gen de referencia GADPH y PAL para optimizar los montajes de los platos de tiempo real. A partir del gradiente se seleccionó la temperatura 55.7 °C (Carril G) que permitía una amplificación nítida para este grupo de genes.

Figura 3-2 PCR convencional en gradiente.
MM Generuler 100pb Plus DNA ladder.



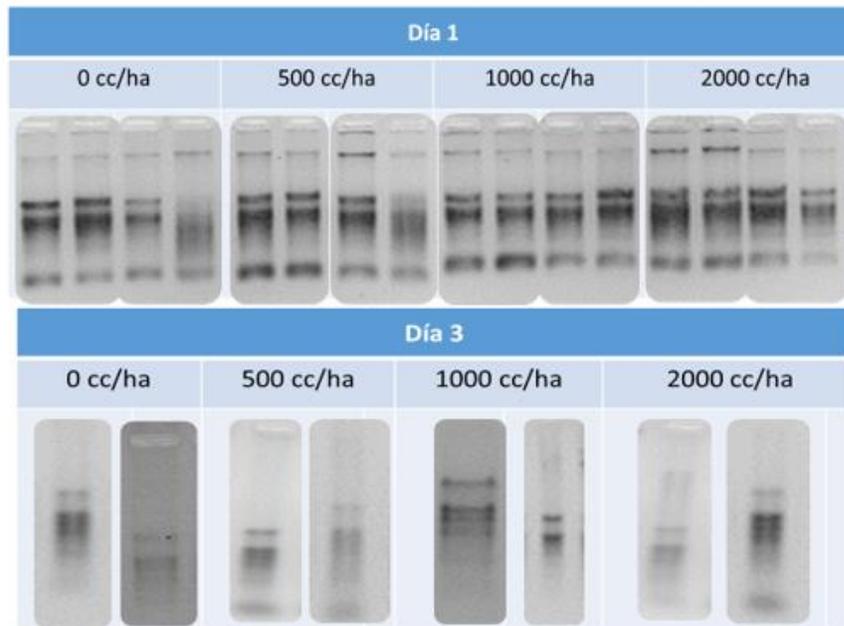
3.2 Obtención del nivel de expresión de los cuatro genes seleccionados en plántulas sometidas a diferentes concentraciones del extracto y análisis estadísticos.

3.2.1 Extracción del RNA y digestión

Se realizó extracción de RNA mediante el reactivo PureLink® Plant RNA Reagent y digestión de las muestras (dos repeticiones biológicas) por cada día de tratamiento a las diferentes concentraciones del extracto de algas marinas obteniéndose dos réplicas de RNA de buena calidad y concentración (Ver Figura 3-3).

Figura 3-3 Extracciones y digestiones de RNA.

Arriba muestra de Extracciones de RNA día 1 Abajo muestra de Digestiones de RNA día 3



A partir de estos RNA digeridos se sintetizó el cDNA y se realizaron los análisis de tiempo real con estas muestras para determinar el nivel de expresión bajo cada una de las concentraciones del extracto de algas marinas.

3.2.2 Cuantificación de la expresión génica

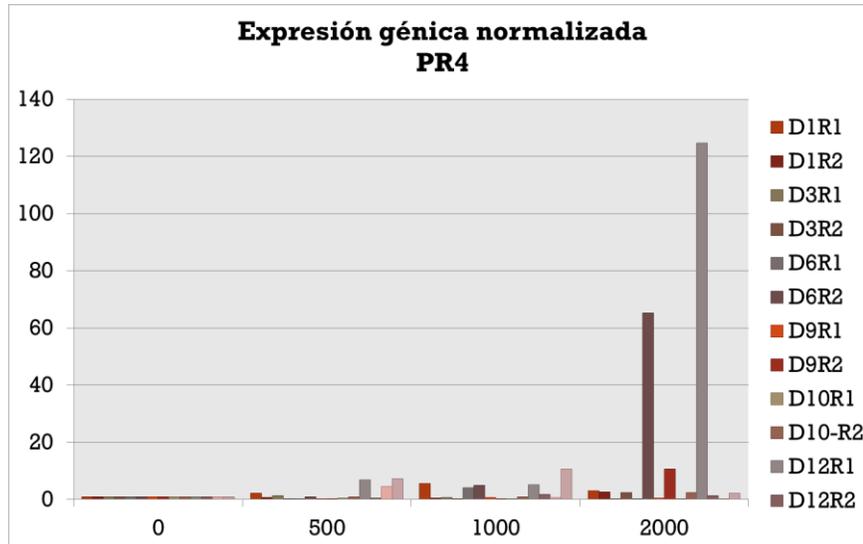
3.2.2.1 Cuantificación de la expresión génica normalizada

Los niveles de expresión relativa fueron calculados mediante un formato Excel aplicando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y comparando cada tratamiento (Concentraciones 500, 1000 y 2000 cc/ha) con el control (0cc/ha) para cada uno de los genes en los diferentes días de muestreo. Los valores que se obtuvieron representan el número de veces más que se expresa el gen evaluado en el tratamiento con relación a el control. La interpretación es la siguiente: Valores iguales a 1 indican expresión similar bajo las mismas condiciones, valores menores a 0.5 indican sub-expresión del gen y valores mayores a 2 que el gen se encuentra sobre-expresado en la muestra dado al error de precisión del método empleado.

A continuación, se muestran los niveles de expresión obtenidos mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en donde se compara la expresión del gen de interés (PR4, POX, PR1 y PAL) con la

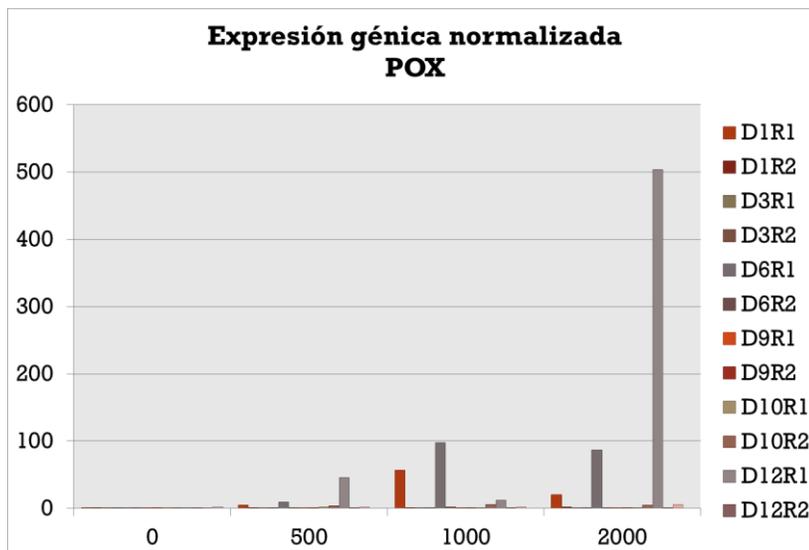
expresión del gen de referencia GADPH. La expresión en cada uno de los tratamientos y concentraciones fue variable y no consistente entre replicas, por lo que se evaluaron de manera independiente.

Figura 3-4 Expresión génica normalizada gen PR4



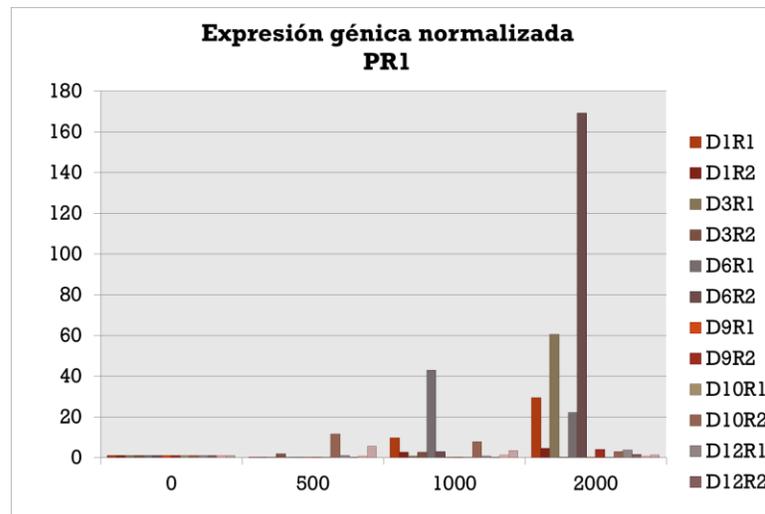
Se observa aumentos mayores a 60 veces en la expresión génica de PR4 por acción del extracto de algas a una concentración de 2000 cc/ha respecto al control del tratamiento - 0cc/ha. Siendo los más altos los presentados en el Día 12 replica 1 y Día 6 replica 2 (124.59 y 65.15 veces, respectivamente).

Figura 3-5 Expresión génica normalizada gen POX



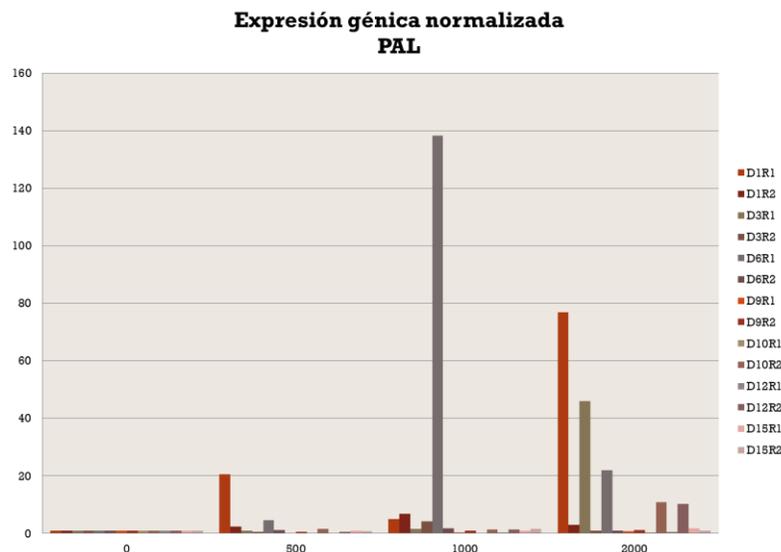
Se observan incrementos por encima de 40 veces para la expresión del gen POX en las concentraciones 500, 1000 y 2000cc/ha con los siguientes valores: 46.2 veces en el día 12 replica 1 a 500 cc/ha; 56.57 en el día 1 replica 1 y 97.5 en el día 6 replica 1 a 1000 cc/ha y finalmente 86.97 en el día 6 replica 1 y 503.68 en el Día 12 replica 1 a 2000 cc/ha.

Figura 3-6 Expresión génica normalizada gen PR1



Se observan incrementos superiores a 40 veces en las concentraciones 1000 cc/ha y 2000 cc/ha así: 42.99 veces en el día 6 replica 1 a la concentración de 1000cc/ha y 60.51 veces en el día 3 replica 1 y con un valor máximo de 169.26 veces en la concentración de 2000cc/ha en el Día 6 replica 2 para el gen PR1.

Figura 3-7 Expresión génica normalizada gen PAL



Para el caso de PAL se observan mayores incrementos en la concentración de 1000cc/ha en el día 6 replica 1 con un nivel de expresión 138.27 veces mayor al gen de referencia y en 2000cc/ha expresiones de 45.89 en el día 3 replica 1 y 76.94 veces en el Día 1 replica 1.

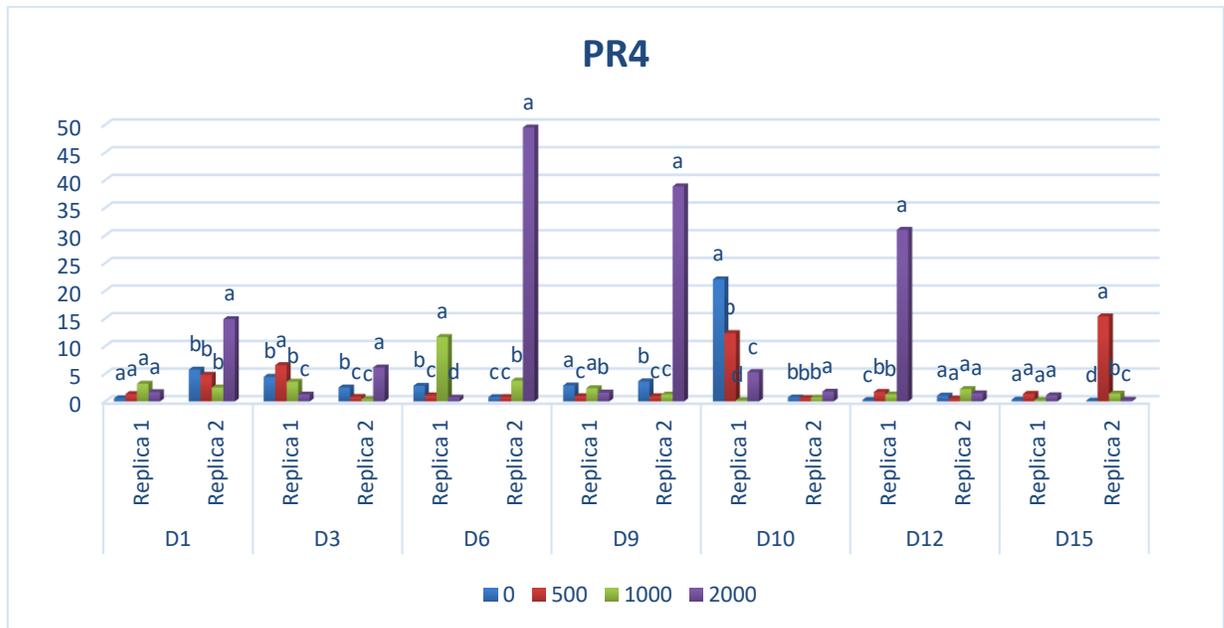
Los mayores niveles de sobreexpresión fueron en el gen PAL en el día 6 replica 1 concentración 1000, en el gen PR4 en el día 12 replica 1 concentración 2000, en el gen PR1 día 6 replica 1 concentración 2000 y POX en el día 12 replica 1 concentración 2000 con valores de 138.27, 124.59, 169.26 y 503.68, respectivamente. Incrementos mayores a 20 veces en el nivel de expresión en el día 1, día 3 y día 6 para los genes POX, PR-1 y PAL principalmente en las dos concentraciones más altas: 1000 y 2000 cc/ha. En el día 12 para PR-4 Y POX en las concentraciones 500 y 2000 cc/ha. Estos incrementos de gran magnitud fueron solo observados en una de las réplicas.

3.2.2.2 Análisis de la expresión génica entre tratamientos

Para hacer relaciones entre tratamientos se empleó una variante de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en la cual se obtiene un valor proporcional a la cantidad de transcrito de cada gen al eliminar el ΔCt del gen blanco en condiciones control. La variante $2^{-\Delta Ct}$ entonces, permite observar la expresión en verdadera magnitud en lugar de la normalizada a un valor constante de 1.

En el gen PR-4 (figura 3-8) para los días D1R2, D6R2, D9R2 y D12R1 la cantidad de transcrito fue mayor para la concentración de 2000 cc/ha siendo altamente significativos. El aumento en la expresión para este gen y de acuerdo a la Figura 3-8 podría iniciar en el D1 replica 2, luego en el día 6 replica 2 se presenta un pico de expresión elevado que va disminuyendo hacia el Día 9. Para el Día 10 la cantidad de transcrito es baja lo cual podría deberse a que la planta no está sometida a estrés biótico y la producción de estas enzimas implican un gasto energético que en ese momento podría considerarse innecesario. Una segunda aplicación del producto realizada en el día 9, permitiría reforzar la respuesta de la planta en la elicitación del gen de defensa observada en el Día 12

Figura 3-8 Representación gráfica de los valores $2^{-\Delta Ct}$ para el gen PR-4. La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo día y replica indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.003$).



La elicitación del gen PR4 presentada en el día 1 replica 2 es consistente a la actividad enzimática de quitinasas observada en plantas de tomate por la aplicación del extracto del alga *Gelidium serrulatum* presentando diferencias significativas a las 24 horas respecto a plántulas control (Ramkisson et al., 2017). Evidenciando que los extractos de algas marronas permiten incrementar la expresión y actividad de quitinasas las cuales son codificadas por el gen PR4 (Moosa et al., 2017; Torres et al., 2012).

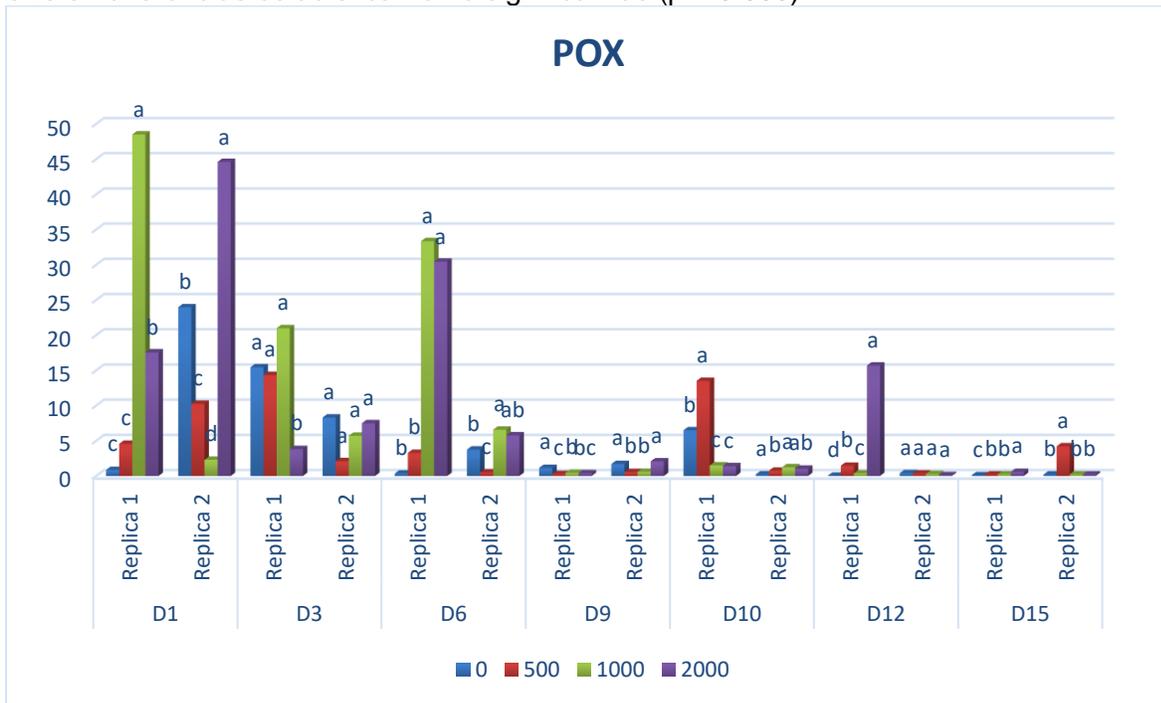
Los picos de actividad enzimática de quitinasas reportados por Torres et al., 2012 en plantas de Williams infectadas por el hongo *P. fijiensis* se presentaron a las 12h, 18h y 9 días y en plantas de Calcuta 4 a las 6h, 48h, 9d y 12días. El tiempo de elicitación para el gen PR-4 inicia alrededor del día 1 en esta investigación sin estrés biótico asemejándose a las respuestas presentadas por la variedad Williams frente a la infección del hongo. Se sugiere que el extracto estaría promoviendo la elicitación de genes de defensa iniciando el proceso de priming sin embargo es necesario hacer un estudio de la respuesta de las plantas asperjadas con el extracto de algas marinas frente a la infección del patógeno *P. fijiensis* para verificar si se mejoran los tiempos de elicitación descritos por Torres et al., 2012.

En el gen POX (Figura 3-9), la cantidad de transcrito fue mayor en los primeros días: D1R1, D1R2, D6R1 entre las concentraciones 1000 y 2000 cc/ha dado por la primera aplicación del extracto. Al contrastar con la actividad enzimática del gen POX descrita por Torres et al., 2012 en plantas de banano variedad Calcuta infectadas por *P. fijiensis* con un pico de expresión a las 24 horas (1 día) se encontró que el gen POX de este trabajo se elicó igualmente en los primeros días (día 1 y día 6) por acción del extracto de algas marinas.

La elicitación temprana del gen peroxidasa de esta investigación fue consistente con los resultados encontrados por Ramkissoon et al., 2017 donde plantas de tomate mostraron diferencias significativas en la actividad enzimática de la peroxidasa entre las 24 y 72 h por la acción individual de tres algas marronas respecto al control sin algas (Ramkissoon et al., 2017).

Figura 3-9 Representación gráfica de los valores $2^{-\Delta Ct}$ para el gen POX.

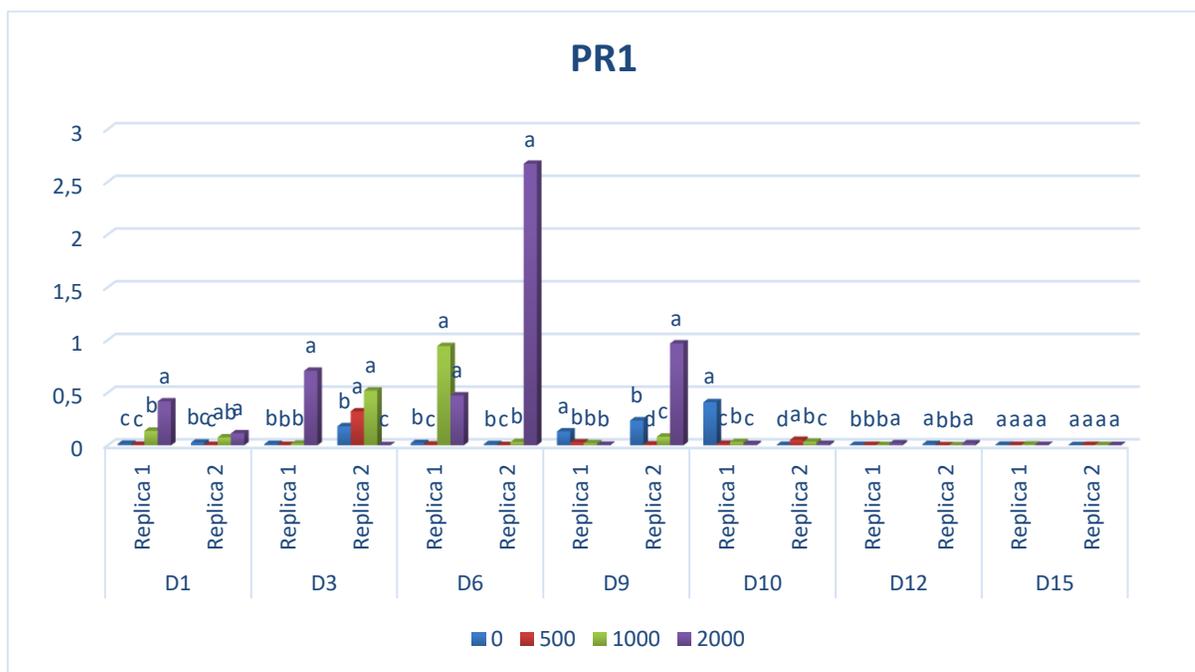
La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo día y replica indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.003$).



Para el gen PR-1 (figura 3-10) el nivel de expresión en todos los días fue inferior a 1, a excepción de la muestra D6R2-2000 cc/ha la cual fue el pico más elevado con un valor de 2.6 indicando que el gen se expresaba en cantidades muy pequeñas respecto a los otros genes evaluados. Estos resultados son consistentes con los encontrados por Ali et al.,

2016 quienes evaluaron el efecto de un extracto de *Ascophyllum nodosum* en plantas de tomate y con el efecto presentado en plantas de tomate por la aplicación del extracto de dos algas marinas pardas caribeñas *Ulva lactuca* y *Sargassum filipendula* estudiadas por Ramkisson et al., 2017.

Figura 3-10 Representación gráfica de los valores $2^{-\Delta Ct}$ para el gen PR-1. La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo día y replica indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.003$).



En el gen PAL (Figura 3-11) la mayor cantidad de transcrito (8.29) se observó en el D6R1 a una concentración de 1000 cc/ha. Sin embargo, se observaron también aumentos estadísticamente significativos respecto al control en la expresión génica en los días D3R1, D6R1 (72-144 h) a una concentración de 2000 cc/ha con un valor máximo de 2.36 en el D3R1 dado por el efecto de una primera aplicación el día 0. Luego una segunda aplicación del producto podría elicitar la respuesta observada en el D10R2 y el D12R2 para la concentración de 2000 cc/ha activando la respuesta más rápido que en la primera aplicación.

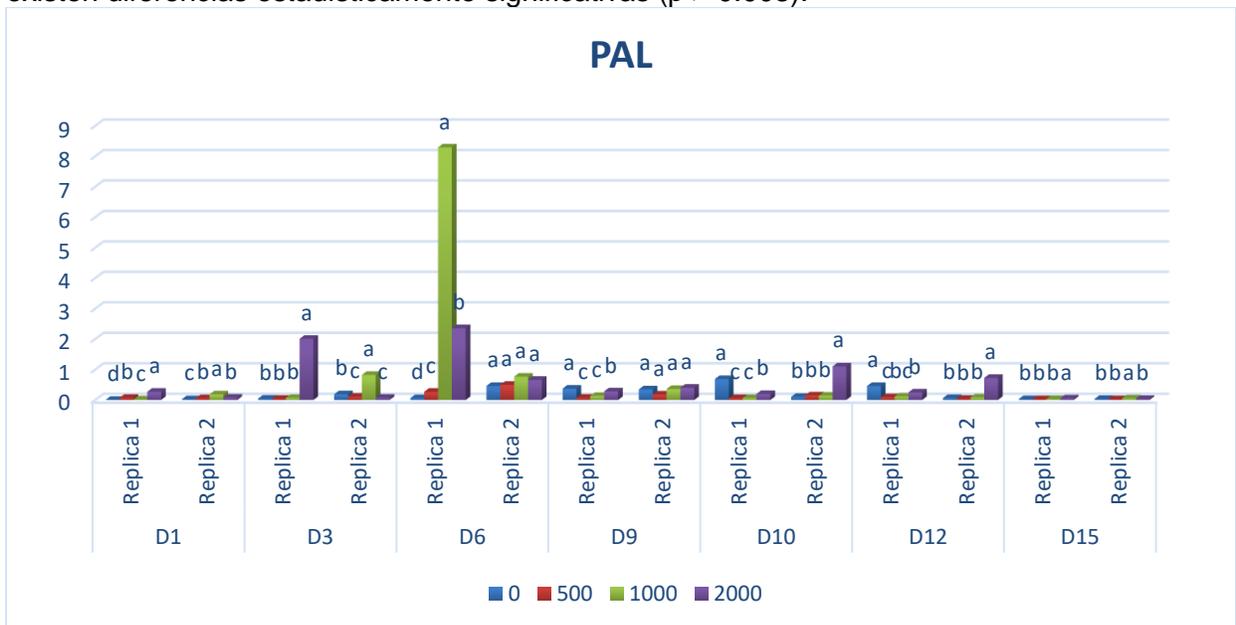
Plántulas de Williams infectadas con el hongo *P. fijiensis* presentan actividad enzimática de PAL aumentada entre los 6 y 9 días. Mientras que en plántulas de la variedad resistente Calcuta 4 se observó una inducción temprana con un mayor pico a las 18h después de la

infección (Torres et al., 2012). En el presente estudio se observó un incremento significativo de la expresión génica de PAL entre los días 3 y 6 (72 y 144h) con un mayor pico de expresión a los 6 días, lo cual permitiría a la planta iniciar el estado de alerta o priming.

La elicitación temprana del gen PAL de esta investigación fue consistente con los resultados de Ramkissoo et al., 2017 en plantas de tomate que mostraron diferencias significativas en la actividad enzimática de PAL entre las 48- 96 horas por la acción individual de tres algas marronas respecto al control sin algas (Ramkissoo et al., 2017).

Figura 3-11 Representación gráfica de los valores $2^{-\Delta Ct}$ para el gen PAL.

La misma letra en columnas diferentes dentro de un mismo día y replica indica que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.003$).



4. Discusión

4.1 Análisis del efecto del extracto de algas marinas sobre la expresión de los genes estudiados.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar el efecto de la aplicación de un extracto comercial de algas marinas a base de *Ascophyllum nodosum* rico en precursores citoquineticos el cual es usado en la agricultura para promover el crecimiento y desarrollo vegetal y por ende mejorar la calidad y rendimiento de los cultivos además de fortalecer la respuesta a condiciones de estrés.

Se evaluó el efecto del extracto sobre la expresión de cuatro genes asociados a defensa vegetal. Los genes PR-4, POX, PR-1 y PAL los cuales codifican para: Proteína relacionada a patogenicidad -4, Peroxidasa, Proteína relacionada a patogenicidad -1 y Fenilalanina amonio liasa, respectivamente. PR-1 se ha asociado a la acumulación de ácido salicílico en la planta, mientras que PR-4 en banano ha sido asociado la acumulación de ácido jasmonico (Li et al., 2016) siendo marcadores de estas rutas de defensa.

4.1.1 Análisis de la expresión génica normalizada- Fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Se fijó un valor de 2 como umbral para evaluar incrementos significativos en la expresión de los genes a partir de la aplicación de la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se observaron incrementos altamente significativos con valores de expresión que superaban las 20 veces sobre su respectivo control para los genes POX, PR-1 y PAL principalmente en las dos

concentraciones más altas: 1000 y 2000 cc/ha. Los genes más sobre-expresados fueron el gen PAL en el día 6 replica 1 concentración 1000 y los genes PR4 Y POX en el día 12 replica 1 concentración 2000.

Los resultados de expresión para cada uno de los genes evaluados no fueron consistentes entre las réplicas de cada día. Se ha observado en estudios en campo el comportamiento desigual de las plántulas de banano frente al uso de este extracto comercial de algas marinas en los primeros ciclos de aplicación (Jorge Ruiz, comunicación personal, marzo de 2017) lo que sugiere la necesidad de un periodo de homogenización de la respuesta vegetal dado por el efecto priming del extracto. Es decir, promover una condición fisiológica en la cual la planta es capaz de mejorar o aumentar más rápidamente las respuestas de defensa, o ambas, frente a factores de estrés biótico o abiótico.

De acuerdo a lo descrito por Conrath et al., 2006 el mecanismo molecular del priming vegetal es aún desconocido, sin embargo, se ha sugerido que puede basarse en la acumulación o modificación postraduccional de una o más proteínas de señalización que, después de ser expresadas o modificadas, permanecen inactivas. Luego en un segundo evento de señalización se podría hiperactivar la proteína de señalización, desencadenando una transducción potenciada u otro mecanismo planteado es la acumulación de factores de transcripción cruciales que durante una fase secundaria podrían inducir directamente el conjunto de genes evitando la expresión preliminar del factor (Conrath et al., 2006).

La inducción del estado priming en las plantas de banano podría mejorarse mediante la aplicación continua del extracto promoviendo así la acumulación de los factores de transcripción o de las proteínas de señalización, ya que en este estudio solo se realizaron dos aplicaciones, estas podrían no ser suficientes para inducir este estado o podrían generar un proceso de priming diferencial entre las plantas obteniéndose diferentes capacidades de potenciamiento entre plantas y replicas.

Por otra parte, de acuerdo al diseño experimental planteado para esta investigación se determinó usar una planta para cada concentración y día de muestra. De tal forma que las dos replicas provenían de una misma planta y cada replica correspondía a una hoja completa. En el banano, las hojas crecen con una frecuencia aproximada de una

hoja/semana en época de lluvias y entre 0.4 y 0.6 hojas/semana en época de sequía (Martinez & Cayón, 2011). Las plántulas se mantuvieron en condiciones controladas con humedad relativa del 95% y a 29°C para lo cual se sugeriría que la frecuencia de emisión de hojas podría estar en 1 hoja/semana, por tanto, las hojas tomadas como replica 1 y replica 2, mínimo tienen una semana de diferencia. El comportamiento desigual en la expresión génica entre replicas podría estar relacionado con la edad de las hojas, ya que estudios han revelado que las hojas jóvenes de banano responden y presentan una composición diferencial a hojas más maduras (Ekanayake, Ortiz, & Vuylsteke, 1994; Freeman & Turner, 1985).

Los aumentos presentados en los niveles de expresión en algunas de las réplicas de los genes PR-4, POX, PR-1 y PAL son mayores a las 20 veces respecto al control cuando se aplica el extracto de algas marinas. Las concentraciones donde se presentaron los máximos niveles de incremento en la expresión génica correspondieron a las concentraciones de 1000 y 2000 cc/ha y se sugiere son un indicio de un proceso de priming en las plantas de banano variedad Williams utilizadas en esta investigación. Este proceso permitiría la activación más eficiente y rápida de los sistemas de defensa vegetal en respuesta a estrés biótico o abiótico (Conrath et al., 2006).

4.1.2 Análisis de la expresión génica entre tratamientos- Variante $2^{-\Delta Ct}$

El segundo modelo de cuantificación relativa, permite observar la cantidad de transcrito de los genes en cada uno de los tratamientos y compararlos entre sí. Los valores de sobreexpresión observados en el análisis normalizado no fueron congruentes con el nivel de expresión obtenido por la variante $2^{-\Delta Ct}$ debido a que la expresión del control en cada día y replica no fue homogénea. La variación presentada en la abundancia de transcritos en los controles entre días obedece a que los transcritos son especialmente sensibles a parámetros ambientales (Schenk et al., 2000) y por la variabilidad inherente a los sistemas biológicos (Willems, Leyns, & Vandesompele, 2008). Por ello, cada día tenía su propio control, para asegurar igualdad de condiciones para la toma de cada una de las muestras.

Así, por ejemplo, el valor de mayor incremento de la expresión obtenido por el primer método 503.68 en el gen POX Día 12 replica 1 concentración 2000 cc/ha al contrastar con lo obtenido en el segundo método muestra que la cantidad de transcrito fue de 15, la cual no es la más alta para el gen POX, el valor de incremento en el número de veces está reflejado por la comparación con su control, el cual mostro una cantidad de transcrito bastante baja 0.03. Debido a esto es que el segundo método es indispensable para comparar el efecto entre tratamientos.

Se presentaron incrementos significativos en la cantidad de transcrito de los genes PR4-POX y PAL principalmente con la aplicación de las mayores concentraciones 1000 y 2000 cc/ha del extracto de algas marinas. La cantidad de transcrito del gen PAL aunque fue significativo fue menor en relación a la presentada por los genes PR-4 y POX cuya acumulación también se deriva del ácido jasmonico. Mientras que el gen PR1 la cantidad de transcrito fue muy bajo para todos los días, réplicas y concentraciones por lo que la aplicación del extracto no estaría promoviendo la elicitación del gen de manera considerable.

Usualmente, se observa una interacción negativa en la acumulación de las moléculas señal ácido jasmonico y salicílico (Pieterse & Van Loon, 1999). Lo cual se vio reflejado en la presente investigación con la elicitación diferencial de los genes asociados a estas moléculas señal PR-4 y PR-1, respectivamente.

El Laminarin un polisacárido de glucosa [(1,3) -b-D glucano con ramificación b- (1,6)] presente en los extractos de algas marinas, estimula las respuestas de defensa vegetal al imitar moléculas estructurales de la pared celular de los patógenos y en consecuencia promueve la inducción de genes que codifican para proteínas de patogénesis (PR)(Khan et al., 2009; Potin, Bouarab, Küpper, & Kloareg, 1999). Estudios han demostrado que el Laminarin interfiere en la acumulación de ácido salicílico, lo cual puede explicar el bajo nivel de expresión del gen PR1 en el presente estudio, dado que este gen es marcador de la vía del ácido salicílico (Ali et al., 2016; Mercier et al., 2001).

La inducción temprana de las enzimas POX y PAL registradas en el trabajo de Torres et al., 2012 para plantas de banano variedad Calcuta 4 determina el éxito en contraste a la variedad susceptible Williams cuya elicitación se presentó 6 días después de la infección con el hongo *P. fijiensis* (Torres et al., 2012). En esta investigación se presentó la inducción temprana de estos dos genes debido a la aplicación del extracto de algas marinas, lo cual permitiría a la planta iniciar un proceso de priming que mejore la respuesta frente al ataque de patógenos, para ello será necesario evaluar la respuesta a la aplicación del extracto de algas en condiciones de estrés biótico.

El nivel de expresión de los genes PAL y POX se relacionan con la actividad enzimática encontrada por Ramkissoon et al., 2017 en plantas de tomate tratadas con tres especies de algas pardas caribeñas. Los dos genes mostraron un incremento significativo de la actividad pasadas las 48h hasta las 96h fenómeno observado en el nivel de expresión en los primeros 3 días en las plantas de banano tratadas con el extracto de *Ascophyllum nodosum*. Estos resultados muestran similares respuestas de elicitación entre especies de algas marinas marronas dado seguramente por la presencia de laminarin y β -glucanos contenidos en ellas.

El gen POX codifica para la enzima peroxidasa, la cual juega un rol importante en la biosíntesis de lignina confiriendo resistencia a la pared celular (Ali et al., 2016) y también protege las células del daño provocado por las especies reactivas de oxígeno ROS (Yang et al., 2017). La producción de especies reactivas de oxígeno corresponde a un mecanismo primario del sistema de defensa vegetal (Wu et al., 2014). Por lo tanto, el incremento en la cantidad de transcrito en los primeros días es coherente con el rol que cumplen estas enzimas ya que permiten tener las especies reactivas de oxígeno en niveles no tóxicos para la célula vegetal

En diversas especies vegetales la actividad de PAL está implicada en la síntesis de numerosos metabolitos como cumarinas, ligninas, flavonoides (incluyendo antocianinas) y componentes fenólicos, estos últimos tiene un efecto dual al actuar como precursores de otras rutas como la biosíntesis de lignina o actuar como fitoalexinas antimicrobianas (Rodríguez et al., 2016; Torres et al., 2012). La acumulación de lignina permite el reforzamiento de la pared para evitar la degradación física y enzimática por parte de agentes patógenos (Li et al., 2016).

Estudios previos han demostrado el aumento de la actividad de PAL en condiciones de estrés biótico, específicamente en el sitio de infección. Indicando que las plantas pueden responder a la presencia de elicitores biológicos como los presentes dentro del extracto de algas marinas utilizado en esta investigación así como se observa en plantas de tabaco donde la estimulación del extracto implica la producción de PAL, ácido cafeico y lipoxigenasa como mecanismo de defensa vegetal (Potin et al., 1999).

Por otra parte, los componentes fenólicos derivados de la actividad PAL como las fenilfenalenonas pueden tener actividad directa contra patógenos como *P. fijiensis* y parecen estar relacionadas con la resistencia exhibida por el cultivar Yangambi Km5 frente al mismo patógeno (Rodríguez Cabal, 2009; Torres et al., 2012).

De acuerdo con la investigación realizada por Torres et al., 2012, la rápida inducción y respuesta dada por la producción de las proteínas asociadas a defensa en Calcuta 4 en contraste con la variedad Williams en banano determina el éxito frente a las interacciones con patógenos. Cabe resaltar que patógenos como *P. fijiensis* que causa una de las principales enfermedades en banano, y cuyo estilo de vida es hemibiótrofico, tiene una primera fase biotrófica en la que ocurre un crecimiento intracelular por aproximadamente un mes antes de que se observe un signo visible de la enfermedad. Esta primera fase es crítica en la interacción, si las plantas de banano susceptibles (Williams) asperjadas por altas concentraciones del extracto de algas marinas activaran rápidamente la expresión de las proteínas de defensa como se observa en las plántulas de Calcuta 4 cuando son infectadas se podría inferir que las variedades susceptibles como Williams tendrían una mayor oportunidad de hacer frente a la infección para controlarla. Por ello, es necesario seguir realizando análisis que permitan establecer si la tendencia observada en este estudio puede afianzarse en una respuesta vegetal más homogénea entre replicas a la acción del extracto de algas marinas.

Los análisis realizados en esta investigación apuntan a un efecto de sobre-expresión en los genes PR-4, POX y PAL a una concentración de 2000 cc/ha, a pesar de la respuesta variable en el nivel de expresión observado entre réplicas biológicas Esta situación podría

considerarse un problema para el uso de este tipo de extractos naturales inductores de respuestas de defensa.

Estos extractos contienen diversos componentes bioactivos que podrían proporcionar un apoyo en la demanda energética de la planta para activar las costosas vías de defensa vegetal (Yang et al., 2017). Sin embargo, una posible causa en las diferencias en la expresión podría ser dada por una rápida desactivación de los genes debido a que la planta no se encuentra en una situación de estrés biótico (enfermedad) así, la planta activa y rápidamente cae la respuesta al no necesitar esas enzimas para evitar un gasto energético innecesario. Para minimizar el efecto del no estrés biológico sobre la expresión de los genes de defensa, se sugiere incrementar el número de repeticiones en el tiempo en posteriores investigaciones.

La resistencia inducida representada por el aumento de la expresión de genes asociados a defensa depende de muchos factores ya que se traduce en una respuesta vegetal en condiciones específicas como el genotipo y fluctuantes como el ambiente, la nutrición vegetal y la medida en la que las plantas han sido inducidas (Walters et al., 2013). Como se ha mencionado anteriormente, diversos estudios han demostrado los diferentes niveles de susceptibilidad que tienen algunas variedades de banano frente al ataque de los principales patógenos clasificando los cultivares en susceptibles, tolerantes y resistentes a la interacción con determinado patógeno. La resistencia exhibida por cada genotipo varía principalmente en los tiempos donde se observan los picos de expresión de las principales enzimas y proteínas de defensa siendo usualmente tardío en los ejemplares susceptibles. Sin embargo, la expresión de resistencia inducida parece no tener relación al rango de resistencia frente a los patógenos como se observa en variedades de cebada primavera que al ser inducidas con los estimulantes ASM, BABA and cis-jasmone algunas variedades no mostraron inducción de resistencia en absoluto (Walters et al., 2013). Por lo tanto, el posible efecto inductor descrito en el presente trabajo solo es aplicable al genotipo de plantas de banano estudiado que corresponde a la variedad Williams.

De acuerdo a los resultados observados en esta investigación el extracto de algas marinas estaría elicitando la acumulación de ácido jasmonico reflejado en la inducción de los genes PR4, POX y PAL principalmente en las más altas concentraciones donde la cantidad de transcrito de estos genes fue mayor.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Los resultados observados sugieren un posible efecto inductor por la aplicación del extracto de algas marinas sobre plántulas sanas de banano variedad Williams. Los niveles de expresión de los genes PR-4, POX y PAL soportan evidencia de la interacción entre las moléculas de señalización celular en plántulas de banano como resultado de la aplicación de un extracto de algas marinas a base de *Ascophyllum nodosum* para activar temporalmente mecanismos de defensa vegetal. La concentración de 2000cc/ha del extracto mostró los mayores niveles de expresión de los genes PR-4, POX y PAL este último en menor proporción a los demás y una menor expresión del gen PR1 que evidencia la interacción negativa entre las moléculas de señalización ácido jasmonico y ácido salicílico.
- Los análisis sugieren que las plantas de banano podrían no utilizar como primera opción vías dependientes de ácido salicílico ya que el gen PR-1 es un gen marcador de esta ruta de defensa y el tratamiento con el extracto no indujo su expresión. Por otra parte, la expresión de PR-4 fue mayor y este gen se ha asociado a la acumulación de ácido jasmonico indicando que la inducción dada por el extracto se enfoca a las vías dependientes de esta molécula señal.

5.2 Recomendaciones

Para evitar las incongruencias en el nivel de expresión entre replicas en un mismo día de análisis se recomienda:

- Aumentar el número de réplicas biológicas

- Para establecer si las plántulas muestran diferentes perfiles de expresión entre días y entre replicas por una respuesta inestable a la aplicación del producto se recomienda realizar un número amplio de aplicaciones previo a los análisis de expresión en tiempo real que permita un establecimiento del efecto priming y la respuesta observada en la elicitación génica sea más homogénea entre replicas.

Someter las plantas a estrés biótico de manera que la respuesta de activación génica se pueda sostener en el tiempo y contrastarlo con plantas infectadas sin la aplicación del producto.

Análisis del nivel de expresión génica con más genes de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, N., Ramkissoon, A., Ramsubhag, A., & Jayaraj, J. (2016). Ascophyllum extract application causes reduction of disease levels in field tomatoes grown in a tropical environment. *Crop Protection*, *83*, 67–75.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.01.016>
- Boller, T., & He, S. Y. (2009). Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, *324*(5928), 742–744. <https://doi.org/10.1126/science.1171647>
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., ... Mauch-Mani, B. (2006). Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(10), 1062–1071. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062>
- Control, Q., & Products, A. (2005). *PureLink™ Plant RNA Reagent*. (12322), 3–6.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, *23*(3), 371–393. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>
- De Coninck, B., Timmermans, P., Vos, C., Cammue, B. P. A., & Kazan, K. (2015). What lies beneath: Belowground defense strategies in plants. *Trends in Plant Science*, *20*(2), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.007>
- Ekanayake, I. J., Ortiz, R., & Vuylsteke, D. R. (1994). Influence of Leaf Age, Soil Moisture, VPD and Time of Day on Leaf Conductance of Various Musa Genotypes in a Humid Forest-Moist Savanna Transition Site. *Annals of Botany*, Vol. 74, pp. 173–178.
<https://doi.org/10.1006/anbo.1994.1106>
- Farouk, S., Safaa, A. Y., & Abeer, A. A. (2012). Farouk-2012.pdf. *Asian Journal of Plant Sciencies*, *11*(1), 36–43.
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, *27*(2–3), 126–139.
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Freeman, B., & Turner, D. W. (1985). The Epicuticular Waxes on the Organs of Different Varieties of Banana (*Musa Spp.*) Differ in Form, Chemistry and Concentration.

- Australian Journal of Botany*, 33(4), 393–408. <https://doi.org/10.1071/BT9850393>
- Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., ... Ourry, A. (2013). Brassica napus Growth is Promoted by Ascophyllum nodosum (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray Analysis and Physiological Characterization of N, C, and S Metabolisms. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 31–52. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9273-9>
- Jayaraj, J., Wan, A., Rahman, M., & Punja, Z. K. (2008). Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection*, 27(10), 1360–1366. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.05.005>
- Jayaraman, J., Norrie, J., & Punja, Z. K. (2011). Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 353–361. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9547-1>
- Jones, J., & Dangl, J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kesari, R., Trivedi, P. K., & Nath, P. (2010). Gene expression of pathogenesis-related protein during banana ripening and after treatment with 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, 56(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.11.012>
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N. ., Rayorath, P., Hodges, D. M., ... Prithiviraj, B. (2009). Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. *J Plant Growth Regul*, 28, 386–399. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>
- Koeck, M., Hardham, A. R., & Dodds, P. N. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular Microbiology*, 13(12), 1849–1857. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01665.x>
- Li, W., Li, C., Sun, J., & Peng, M. (2016). Metabolomic , biochemical and gene expression analyses reveal the underlying responses of resistant and susceptible banana species during early infection with *Fusarium oxysporum* f . sp . cubense. *Plant Disease*, 1–41.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Machado, L. P., Matsumoto, S. T., Jamal, C. M., da Silva, M. B., da Cruz Centeno, D.,

- Neto, P. C., ... Yokoya, N. S. (2014). Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1739–1744. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6483>
- Martinez, A., & Cayón, D. (2011). Dinámica del Crecimiento y Desarrollo del Banano (Musa AAA Simmonds cvs. Gran Enano y Valery) Dynamics of Growth and Development of Banana (Musa AAA Simmonds cvs. Gran Enano and Valery). *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 64(2), 6055–6064. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n2/v64n2a03>
- Mercier, L., Lafitte, C., Borderies, G., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M. T., & Fournier, J. (2001). The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytologist*, 149(1), 43–51. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00011.x>
- Moosa, A., Farzand, A., Sahi, S. T., & Khan, S. A. (2017). Transgenic expression of antifungal pathogenesis- related proteins against phytopathogenic fungi – 15 years of success. *ISRAEL JOURNAL OF PLANT SCIENCES ISRAEL JOURNAL OF PLANT SCIENCES*, 9978(May). <https://doi.org/10.1080/07929978.2017.1288407>
- Nair, P., Kandasamy, S., Zhang, J., Ji, X., Kirby, C., Benkel, B., ... Prithiviraj, B. (2012). Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 13, 643. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-643>
- Panjehkeh, N., & Abkhoo, J. (2016). *Influence of Marine Brown Alga Extract (Dalgin) on Damping-off Tolerance of Tomato*. 7(7), 2369–2374.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pieterse, C. M. J., & Van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 4(2), 52–58. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01364-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01364-8)
- Potin, P., Bouarab, K., Küpper, F., & Kloareg, B. (1999). Oligosaccharide recognition signals and defence reactions in marine plant-microbe interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 2(3), 276–283. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80048-4)
- Ramkisson, A., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2017). *Phytoelicitor activity of three Caribbean seaweed species on suppression of pathogenic infections in tomato plants*. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1160-0>

- Rodríguez, H. A., Rodríguez-Arango, E., Morales, J. G., Kema, G., & Arango, R. E. (2016). Defense gene expression M fijiensis banana. *Plant Disease*, 100(6), 1170–1175.
- Rodríguez Cabal, A. (2009). *Análisis de la expresión del gen fenilalanina amonio -liasa (PAL) durante la interacción con Mycosphaerella fijiensis en los cultivares Calcutta 4 (resistente) y Williams (susceptible)* (Vol. 4).
- Sánchez Timm, E., Hidalgo Pardo, L., & Pacheco Coello, R. (2016). Identification of Differentially-Expressed Genes in Response to Mycosphaerella fijiensis in the Resistant Musa Accession “ Calcutta-4 ” Using Suppression Subtractive Hybridization. *PLoS ONE*, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160083>
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., & Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11655–11660. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11655>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., & Martin, T. (2013). Plant biostimulants : a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *J Appl Phycol*. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9>
- Sinha, M., Singh, R. P., Kushwaha, G. S., Iqbal, N., Singh, A., Kaushik, S., ... Singh, T. P. (2014). Current Overview of Allergens of Plant Pathogenesis Related Protein Families. *The ScientificWorld Journal*, 2014, 19.
- Thermofisher. (2000). *Nanodrop 2000*. <https://doi.org/ONLINE>
- Torres, J. M., Calderón, H., Rodríguez-Arango, E., Morales, J. G., & Arango, R. (2012). Differential induction of pathogenesis-related proteins in banana in response to Mycosphaerella fijiensis infection. *European Journal of Plant Pathology*, 133(4), 887–898. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0012-7>
- Walters, D. R., Ratsep, J., & Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance : challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*, 64(5), 1263–1280. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert026>

- Willems, E., Leyns, L., & Vandesompele, J. (2008). Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Analytical Biochemistry*, 379(1), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.04.036>
- Wu, S., Shan, L., & He, P. (2014). Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Science*, 228, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.03.001>
- Yang, J., Sun, C., Zhang, Y., Fu, D., Zheng, X., & Yu, T. (2017). Induced resistance in tomato fruit by γ -aminobutyric acid for the control of alternaria rot caused by *Alternaria alternata*. *Food Chemistry*, 221, 1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.061>
- Yasmin, N., & Saleem, M. (2014). Biochemical characterization of fruit-specific pathogenesis-related antifungal protein from basrai banana. *Microbiological Research*, 169(5–6), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.08.010>