



Uso de RAISAN en el cultivo de banano (*Musa AAA*), efecto sobre la biomasa de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), y expresión de genes relacionados con sistema de resistencia adquirida (SAR).

Ing. Olman Ricardo Quirós Sandí

Consultor en Biología Molecular.

Te. (506)8998-7798

El banano y el plátano están de cuarta posición entre los alimentos más consumidos en el mundo después del trigo, arroz y maíz con un valor de exportación de US\$ 4.5 a 5 billones por año durante 1998 a 2000 (Arzanlou *et al* 2007). La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) es una seria amenaza para las plantaciones bananeras a nivel mundial porque reduce la capacidad fotosintética de las plantas a través de lesiones necróticas que provoca, con reducción de plantas y calidad de la fruta (Arzanlou *et al* 2007). Recientemente la PCR (Polymerase Chain reaction) ha emergido como una herramienta robusta para el diagnóstico de detección de hongos fitopatógenos, contribuyendo esto al entendimiento de esta enfermedad en las plantas de banano (Johanson *et al* 1994).

El tratamiento de plantas con inductores de resistencia es una alternativa que se ha venido implementando frente al control de enfermedades en otros patosistemas pero de manera limitada en el cultivo del plátano y banano contra *Mycosphaerella* spp. A este mecanismo se le ha denominado Resistencia Adquirida Sistémica (RSA) y consiste en la expresión de respuestas por parte de la planta luego de la infección por un patógeno o de manera similar por el tratamiento con inductores de resistencia (Yuanli Wu *et al* 2013).

El quitosano es un compuesto preparado comercialmente a través de la desacetilación alcalina de la quitina obtenida del exoesqueleto de crustáceos marinos. Este compuesto es soluble en ácidos débiles y puede utilizarse directamente como agente antifúngico o bien como inductor de respuestas de defensa en las plantas (No y Meyers, 1995). Roller y Covill (1999) reportaron la aplicación del quitosano para prevenir el crecimiento de microorganismos en jugos no pasteurizados, mientras que Salvador *et al.* (1999) lo utilizaron incorporándolo en una cubierta que aumentó la vida de postcosecha del aguacate. El quitosano es capaz de elicitar respuestas defensivas en las plantas entre ellas la síntesis de compuestos de bajo peso molecular como las fitoalexinas, síntesis de calosa, lignificación, estimulación de la actividad de las enzimas fenilalanina amonioliasa (PAL) glucanasa y quitinasa (Ben Shalom, 1999).

Al aplicarlo directamente a los tejidos de la planta el quitosano induce la peroxidación de lípidos (Dubery *et al.*, 2000) y la producción de especies reactivas de oxígeno (Orozco-Cardenas y Ryan, 1999), promoviendo de esa forma la activación de respuestas de defensa contra el estrés biótico y abiótico (Lee *et al.*, 1999). La expresión de seis genes relacionados con defensa de las plantas de banano (*Musa AAA*) frente a patógenos, catalasa, Peroxidasa y pectina acetil-esterasa, fueron fuertemente relacionadas y están vinculadas a respuestas de defensa. Esto implica que el modo de acción de la planta para defenderse de patógenos es posiblemente debido a un fuerte aumento oxidativo, por la inducción del metabolismo secundario, que incluye la vía del fortalecimiento de la pared celular y la producción de fenilpropanoides. Los genes que confieren



resistencia a las enfermedades y plagas de banano se encuentran en progenitores silvestres de *Musa* spp. La variedad, Calcuta IV , un plátano diploide silvestre que produce una muy baja calidad de fruta casi incomedible , tiene resistencia a la mayoría de los patógenos , incluyendo sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* y *M. musicola* Mulder (Sigatoka amarilla) (Jeger et al. , 1995) . Varios genes-R con homología putativa han sido previamente aislados de Calcuta IV por Taylor (2004) , así como por Peraza - Echeverría et al. (2007) .

La *Sigatoka negra* tiene actualmente como principal método de control el químico, ya que se reportan más de 40 aplicaciones al año, lo que representa del 40 al 60% del costo total de producción. El uso excesivo de agroquímicos en la agricultura para controlar la enfermedad, ha provocado acumulación de residuos en el ambiente, destrucción de la flora y fauna silvestre benéfica e intoxicaciones así como también, enfermedades en el hombre; sumado a lo anterior la pérdida de sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a ciertas moléculas químicas, debido a su enorme plasticidad genética; dada por su doble tipo de reproducción vegetativa. Esta situación crea la necesidad de buscar medidas alternas que permitan reducir los daños causados por la enfermedad y disminuir el uso de fungicidas, por lo que la tendencia actual se dirige a la búsqueda de biofungicidas, una alternativa viable es el uso de productos orgánicos como el quitosano.

Tradicionalmente , el diagnóstico del complejo de la Sigatoka se basa en los síntomas esta , mismos que han limitado el valor del diagnóstico debido a su similitud y el período de latencia que varía de 14 a 35 días, dependiendo las condiciones climáticas y cultivar (Balint-Kurti et al. 2001, Marín et al 2003). Las especies de *Mycosphaerella* se distinguen por las características morfológicas y se requiere mucha experiencia para distinguir las, incluyendo la morfología de ascosporas, patrones de germinación y pequeñas diferencias en la morfología de su estado anamorfo (Crous, 1998, Crous et al 2004). Además, el diagnóstico tradicional es lento e inadecuado para diseñar estrategias de erradicación y cuarentena. En los últimos años, la reacción en cadena de polimerasa convencional (PCR) ha emergido como una herramienta robusta para el diagnóstico y detección de hongos fitopatógenos y ha contribuido en gran medida en el diseño de programas para el manejo de enfermedades (Johanson et al 1994).

En las reacciones de PCR en tiempo real, el número de ciclos específicos en el cual un aumento estadísticamente significativo en la fluorescencia es detectada se define como el ciclo umbral. Por definición, el valor Ct es inversamente proporcional al logaritmo del valor de la cantidad inicial de ADN del primer (secuencia). Por lo tanto, la tecnología de PCR en tiempo real permite ser utilizada ampliamente para detectar y cuantificar el ADN de patógenos en planta (Lievens et al. 2005). Esta técnica permite la cuantificación de ADN en concentraciones muy bajas (pg / ml), y se ha aplicado la detección cuantitativa de patógenos de plantas, agentes de control biológico, en experimentos de interacción planta-microorganismos (Valsesia et al. 2005), y en estudios de monitoreo.

El objetivo de esta investigación trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación foliar de RAISAN (quitosano) sobre la biomasa de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y la expresión de genes relacionados con resistencia a patógenos en *Musa* AAA.



Materiales y métodos.

Para evaluar el efecto de RAISAN sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* en hojas de banano, se estableció un área experimental en una finca comercial (Las Juntas en Cariari de Guápiles). Se aplicó RAISAN en un bloque, dirigido al follaje con bomba de motor. Otro bloque sirvió como testigo manteniendo el manejo convencional de la finca con aplicación aérea de fungicidas. Se tomaron 15 muestras de hoja 3 por fecha de evaluación para cada bloque. Las muestras se procesaron en el Laboratorio Molecular Agropecuario (LAMA). Las aplicaciones fueron realizadas con sistemas de aspersión terrestre en el bloque con RAISAN y se suprimió totalmente la aplicación de cualquier molécula química (fungicida) para esta la dosis utilizada fue 2,5L/ha de RAISAN.

La extracción de ARN, ADN y la síntesis de ADNc fue a partir de material extraído de las hojas de banano utilizando el kit RNeasy Plant Mini (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se almacenaron a -80°C . La calidad y la cantidad de ARN y ADN se determinaron con un BioSpecnano, espectrofotómetro de SHIMADZU BIOTECH. El ARN se analizó bajo iluminación UV para la presencia de bandas ribosomales distintas y para determinar ARN degradado por electroforesis en gel de agarosa; en condiciones no desnaturalizantes en un 1% (w / v). El tratamiento con DNasa de ARN se realizó mediante la adición de en RNasa libre de DNasa (1 U / I-II)(Fermentas, Hanover, Estados Unidos). La cuantificación de PCR en tiempo real para *Mycosphaerella fijiensis* se realizaron según lo descrito por (Arzanlou et al., 2007).

Expresión de genes mediante qRT-PCR

La expresión de seis genes relacionados con resistencia a patógenos (Tabla 1) en las hojas de banano se realizó utilizando PCR en tiempo real de transcripción inversa-PCR (QRT-PCR). Cuatro de estos genes, PR-1, catalasa, pectina acetilesterasa (PAE) y endoquitinasa (PR-3), se reportan como activados en cultivares Cavendish tolerantes a patógenos como *Fusarium* sp. (Van den Berg et al., 2007). Se utilizó un gen como control endógeno, Musa 25S rRNA (AF 399 949), y porque su expresión se mantiene relativamente constante a través de todos los tratamientos. Se sintetizaron cebadores para estos genes por Operón (Colonia, Alemania),(Tabla 1). Los cebadores fueron probados en reacciones de PCR convencionales en un volumen total de 12,0 μL que contenían 0.7 μL de 15 mM MgCl_2 . 1.25 μL de 10 X buffer, 1.25 mezcla μL dNTP 2,5 μM , 1,0 μM de cada cebador específico (5 μM) y 0,1 U Taq ADN polimerasa (1 U / μL) (Fermentas Ltd) y 1,0 μL de cDNA. Las muestras se calentaron a 95°C durante 3 min, y después se sometieron 44 veces a 94°C durante 30 s, 65°C durante 30 s, y 72°C durante 30 s, con una etapa de elongación final a 72°C durante 10 min. La PCR se llevó a cabo en un termociclador SeeAMP de (Seegene). Los productos de PCR se separaron en un 2% (w / v) gel de agarosa y se visualizaron bajo iluminación UV.

La PCR cuantitativa (QRT-PCR) se realizó usando el kit SYBR Green, Thermo Scientific (PIKOREAL 96), utilizando las primeras cadenas de cDNA como plantilla, como se especifica en el manual de instrucciones. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: pre-incubación durante 10 min a 95°C seguido de 55 ciclos,



consistiendo cada uno de 10 s de desnaturalización a 95 ° C, 10 s recocado a 65 ° C, 10 s de extensión del cebador a 72 ° C.

Tabla 1. Secuencias para cuantificar la expresión (QRT-PCR) inversa cuantitativa en hojas de banano; de genes relacionados con la defensa de las plantas al ataque de patógenos después de la infección.

Gene objetivo	Forward primer sequence (5' a 3')	Reverse primer sequence (5' a 3')	Tamaño producto	del
Peroxidase-1	CGGTAGGATCCAAAGAAAGC	TTCAGAGCATCGGATCAAGG	150 bp	
Endochitinase2	GTCACCACCAACATCATCAA	CCAGCAAGTCGCAGTACCTC	150 bp	
PAL-1	CCATCGGCAAACATCATGTTC	GTCCAAGCTCGGGTTTCTTC	150 bp	
PR-1	TCCGGCCTTATTTACATTC	GCCATCTTCATCATCTGCAA	126 bp	
Catalase2	AAGCATCTTGTCGTCGGAGTA	CGCAACATCGACAACTTCTTC	96 bp	
PAE	GGCTCTCCTTTCTGGATGTTC	TCAGCAAGGCACTTGACTTTT	105 bp	
Musa25SrRNA2	GTAACGGCGGGAGTCACTA	TCCCTTTGGTCTGTGGTTTC	106bp	
MFBF	M. CGACACAGCAAGAGCAGCTTC	MFBRtaq TTCGAAAGCCTTGCACTTCAA	142 bp	
<i>fijiensis</i>				
MFBP	CTGAGCACGACTGACCACAACGCA			

Secuencias de primers previamente identificadas por Forsyth (2006) y 2 secuencias de primers previamente identificadas por Van den Berg et al. (2007).

Resultados.

Evaluación en campo.

Síntomas externos, propios de la sigatoka negra en banano fueron identificados, en las dos áreas experimentales; estas presentan los síntomas tradicionales de necrosis y amarillamiento causados por sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Todas las evaluaciones fueron hechas en hoja número 3, identificadas y clasificadas para su envío al laboratorio. El análisis de cuantificación de ADN de sigatoka se realizó en forma rutinaria comparando la biomasa presente en hoja número 3 con un control, confirmándose la presencia del hongo en todas las muestras analizadas.



Análisis de expresión de genes relacionados con defensa a patógenos.

La extracción de ARN y síntesis de ADNc, ARN purificado a partir de las hojas de banano; mostro ser de alta calidad esto se confirmó por espectrofotometría.

La expresión de genes mediante PCR en tiempo real.

La eficiencia de PCR se evaluó en un rango dinámico; utilizando una curva de regresión se obtuvo producto después de la amplificación de una dilución seriada para todos los primers (tabla 1). Los perfiles de expresión para todos los sistemas utilizados variaron significativamente con y sin RAISAN. La expresión constitutiva de genes que codifican las proteínas anti fúngicas PR- 1 y PR- 3 fueron significativamente mayor en el área con RAISAN, que en el área con tratamiento químico. La expresión de Catalasa fue significativamente mayor en el área con RAISAN, en comparación con la expresión en el área con tratamiento convencional (testigo). La expresión constitutiva de PAE fue significativamente mayor con RAISAN que en al área con manejo tradicional (químico). PAE se expresó más prolíficamente en el tratamiento con RAISAN.

En la figura (1) se muestra la dinámica de la enfermedad cuantificada en hoja número 3 después de las aplicaciones con el producto RAISAN. Claramente se observa un descenso significativo y en forma sostenida de la biomasa del patógeno Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plantas de banano (Gran Naine).

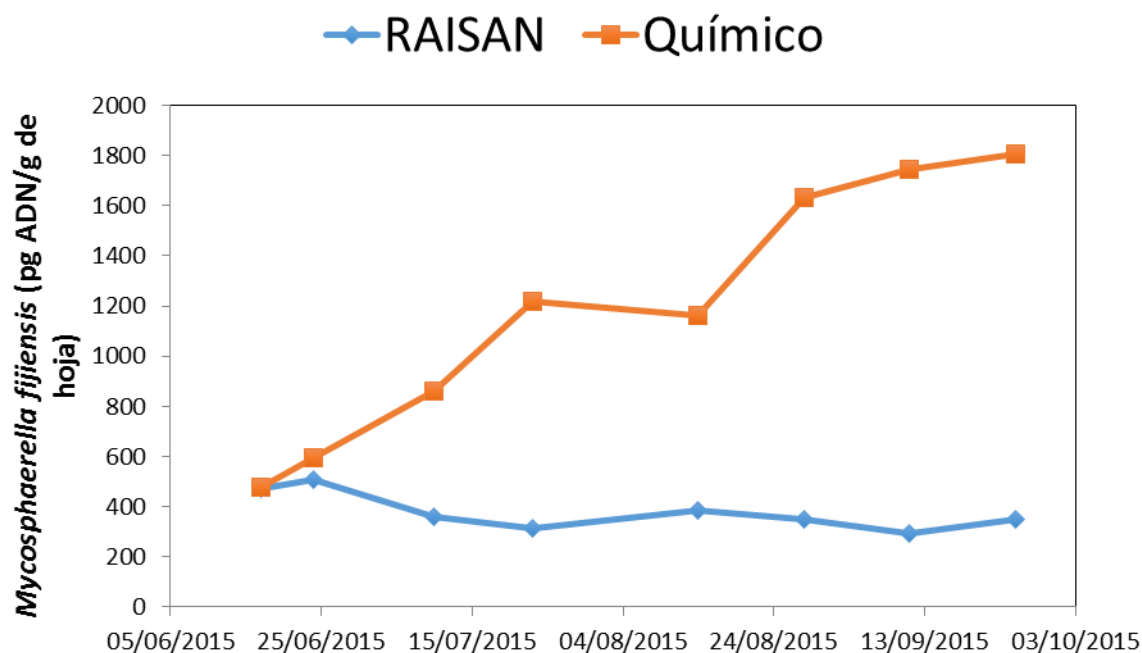


Figura (1) Biomasa de Sigatoka negra evaluada en campo por métodos moleculares, (PCR en tiempo Real).



Discusión.

La respuesta de defensa de una planta a un patógeno es una cadena altamente regulada por diferentes eventos y puede ser ampliamente clasificada en una respuesta temprana o tardía. A partir del reconocimiento de patógenos, eventos de identificación celular desencadenan una respuesta temprana que incluyen cambios en los flujos de iones, síntesis de sustancias reactivas de oxígeno y cambios en la transcripción de genes.

En este caso , a menudo se observa un evento de muerte celular hipersensible localizada, la producción de compuestos antimicrobianos ,fortificación de la pared celular, y la activación de resistencia sistémica adquirida (SAR) , que se traduce en una resistencia de larga duración que se establece en áreas infectadas y no infectadas de la planta (Romeis , 2001). Los genes investigados en este estudio caen en estas dos categorías y se pueden dividir en grupos funcionales básicos. Catalasa y POX son genes implicados en el aumento oxidativo ; POX también está involucrado en el metabolismo secundario , junto con los sistemas PAL y PAE , específicamente en el fortalecimiento de la pared celular, y la producción de fenilpropanoides. PR- 1 y PR- 3 son proteínas antifúngicas que están involucradas en la degradación de componentes de la pared celular de hongos.

Estos genes son potencialmente clave en la defensa y respuesta de los cultivares de banano tolerantes y / o resistentes a patógenos. Todos los genes se expresaron constitutivamente en niveles más altos (figura 2), con el tratamiento RAISAN. En todos los casos, la expresión constitutiva fue mayor con RAISAN que el tratamiento con el programa compuesto por la rotación de moléculas químicas y productos protectantes. Los genes PR antifúngicos son especialmente interesantes en Cavendish. Se nota como estos genes expresan un nivel significativamente mayor en el tratamiento con RAISAN. La disminución significativa de la biomasa de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), sugiere un aumento de los niveles de proteínas anti-hongos que se producen constitutivamente en el cultivo del banano. Es importante señalar que la catalasa y POX tienen una expresión alta en el tratamiento con RAISAN, y que tal vez permite una respuesta más rápida a los ataques de patógenos en esta área tratada. La ausencia de expresión constitutiva alta en el área sin RAISAN, sugiere que existe un factor que afecta la expresión de estos genes.

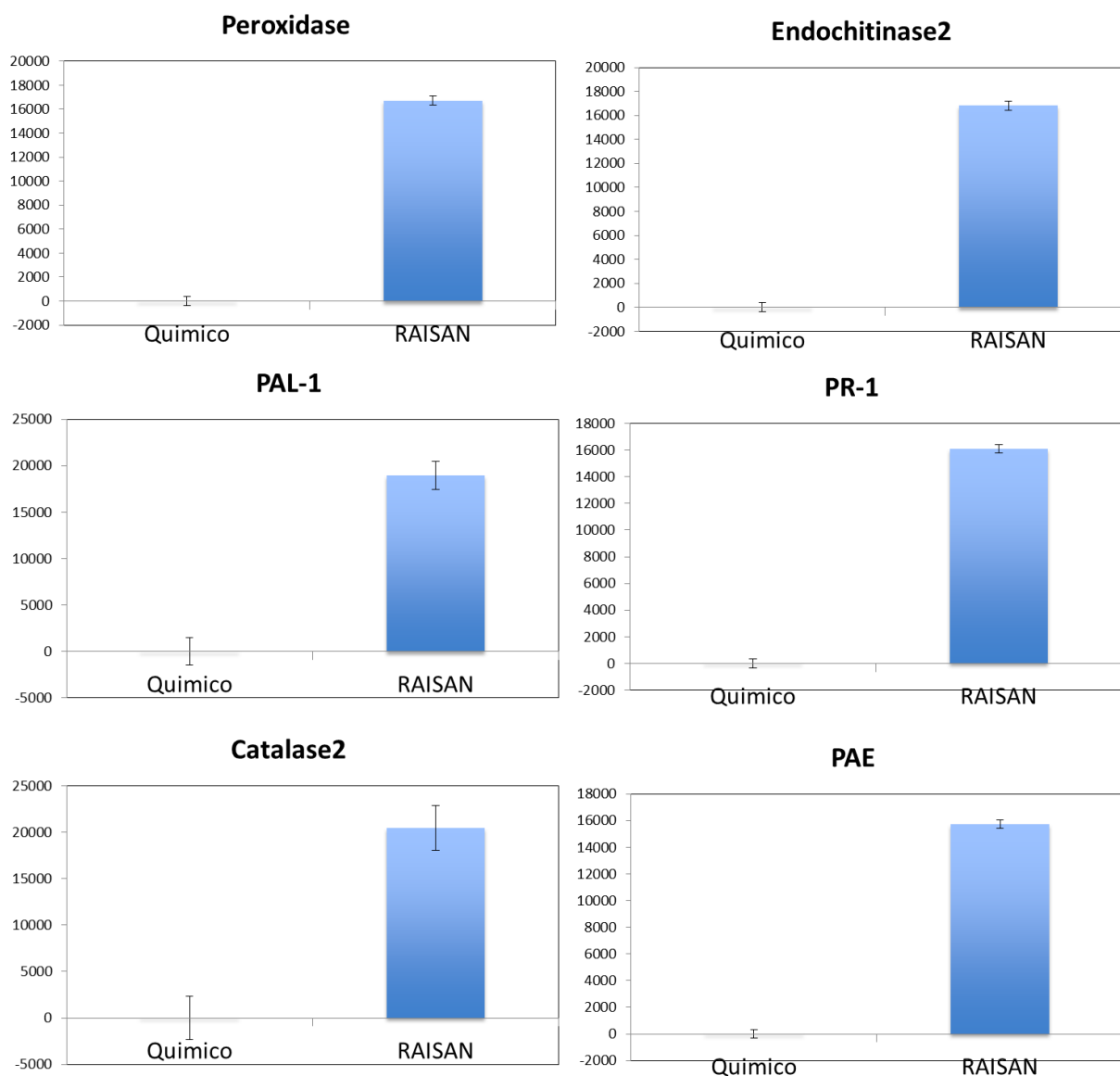


Figura 2. Resultados de lecturas de expresión relativa de genes post-aplicación de RAISAN y con tratamiento químico convencional, de Endochitinase (PR-3), Phenylalanine amonia lyase (PAL), Catalase, Peroxidase (POX) y Pectin Acetylerase (PAE). La relación de expresión se determinó con PCR entiempro real y los datos se analizaron mediante ANOVA y DUNCAN ($P < 0,05$).



Literatura Citada

1. Ben Shalom Composition and methods for controlling fungal disease in plants US patent No. 5, 965,545, 1999.
2. Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.
3. Arzanlou, M., Abeln, E., Kema, G., Waasliwijk, C., Carlier, J., Vries, I., Guzmán M., y Crous, P. Molecular Diagnostic for the Sigatoka Disease Complex of Banana. *PHYTOPATHOLOGY*. 1112-1117p.
4. Johanson, A., Crowhurst, R.N., Rikkerink, E. H. A., Fullerton, R, A., and Templeton, M. D. 1994. The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathol.* 43:701-707.
5. No, H.K. and S.P. Meyers. 1995. Preparation and characterization of chitin and chitosan – a review. *J. Aquatic Food Product Tech.* 4:27-52.
6. Roller, S., and N. Covill. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 47:67-77.
7. Salvador, L., S.P. Miranda, N. Aragón y V. Lara. 1999. Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 43:18-23.
8. Ben Shalom Composition and methods for controlling fungal disease in plants US patent No. 5, 965,545, 1999.
9. Dubery, I.A., L.G. Teodorczuk, A.E. Louw. 2000. Early responses in methyl jasmonate-preconditioned cells toward pathogen-derived elicitors. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* 3:105-110.
10. Orozco-Cardenas, M. and C.A. Ryan. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6553-6557.
11. Jeger, M.J., Eden-Green, S., Johanson, A., Waller, J.M. and Brown, A.E. 1995. Banana Diseases. In: Gowen S, editor. *Banana and Plantains*. Chapman and Hall, London, UK, 317-381 pp.
12. Taylor, K.M. 2004. Characterisation of potential fungal disease resistance genes in banana. PhD Thesis, Queensland University of Technology, Australia.



13. Peraza-Echeverria, S., James-Kay, A., Canto-Canche, B. and Castillo-Castro, E. 2007. Structural and phylogenetic analysis of *Pto-type* disease resistance gene candidates in banana. *Molecular Genetics and Genomics*, 278: 443-453.
14. Balint-Kurti, P. J., May, G. D., and Churchill, A. C. L. 2001. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: A tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:9-15.
15. Marin, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M., and Sutton, T. B. 2003. Black Sigatoka an increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis.* 87:208-222.
16. Crous, P. W. 1998. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycol. Mem.* 21:1-170.
17. Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Pongpanich, K., Himaman, W., Arzanlou, M., and Wingfield, M. J. 2004. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. *Stud. Mycol.* 50:457-469.
18. Lievens, B., and Thomma, B. P. H. J. 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology* 95:1374-1380.
19. Valsesia, G., Gobbin, D., Patocchi, A., Vecchione, A., Pertot, I., and Gessler, C. 2005. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 95:672-678.
20. Van den Berg, N., Berger, D.K., Hein, I., Birch, P.R.J., Wingfield, M.J. and Viljoen, A. 2007. Tolerance in banana to Fusarium wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Molecular Plant Pathology*, 8: 333-341.
21. Forsyth, L.M. 2006. Understanding the role of induced resistance in the control of Fusarium of banana, Ph.D Thesis, University of Queensland, Australia.
22. Van den Berg, N., Berger, D.K., Hein, I., Birch, P.R.J., Wingfield, M.J. and Viljoen, A. 2007. Tolerance in banana to Fusarium wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Molecular Plant Pathology*, 8: 333-341.
23. Romeis, T. 2001. Protein kinases in the plant defence response. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 407-414.

