



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniero Agrónomo.

Título del Proyecto de Investigación:

**“Diversidad genética de plantaciones de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*
establecidas en el Ecuador utilizando RAPD’s”**

Autor:

Scott David Cruz Arévalo

DIRECTOR PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

Quevedo – Los Ríos - Ecuador.

2017

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **SCOTT DAVID CRUZ ARÉVALO** declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, y por la normatividad institucional vigente.

SCOTT DAVID CRUZ ARÉVALO

CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Egresado Scott David Cruz Arévalo, realizó el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo titulado **“Diversidad genética de plantaciones de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* establecidas en el Ecuador utilizando RAPD’s”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas.

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO



Dokument [TESIS CRUZ SCOTT Introducion para urkund.docx](#) (D30446387)

Inskickat 2017-09-08 10:37 (-05:00)

Inskickad av hcanchignia@uteq.edu.ec

Mottagare hcanchignia.uteq@analysis.orkund.com

Meddelande tesis Cruz [Visa hela meddelandet](#)

7% av det här c:a 26 sidor stora dokumentet består av text som också förekommer i 5 st källor.



Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS CRUZ SCOTT Introducion para urkund.docx (D30446387)
Submitted: 2017-09-08 17:37:00
Submitted By: hcanchignia@uteq.edu.ec
Significance: 7 %

Sources included in the report:

PROYECTO INVESTIGACIÓN MUSACEÁS GUERRERO 25.01.17.docx (D25269517)
Tesis de Musaceas Pamela Guerrero 22.12.16.docx (D24584150)
TESIS RUIZ CARRIEL LUIS 30.07.2015.docx (D14997130)
TESIS KARLA BERENISSE VELOZ MARTINEZ 16.09.2015.docx (D15301941)
URKUND TESIS FINAL CRISTIAN.docx (D13326762)

Instances where selected sources appear:

33

Dr. Hayron Fabricio Canchignia Martínez

DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

**“Diversidad genética de plantaciones de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*
establecidas en el Ecuador utilizando RAPD’s”**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Aprobado por:

Ing. Ignacio Sotomayor Herrera M. Sc
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Ing. David Campi Ortiz M. Sc
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Fernando Abasolo Pacheco
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Padre Celestial, por haber iluminado mi entendimiento en estos años de carrera universitaria y por haberme dado fuerzas para perseverar.

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a mis maestros por brindarme su amistad, sus valiosos conocimientos y forjarme como profesional y como persona.

Al Dr. Hayron Canchignia Martínez Director de tesis, por compartir sus conocimientos y direccionar el trabajo de investigación, con su background motivándome siempre alcanzar la meta propuesta en la investigación que conduce a la culminación de mi carrera profesional de pregrado.

A la Dra. Mercedes Carranza por direccionarme en mi tema de proyecto de investigación y por brindarme su amistad.

A la Lda. Daysi Tello Rizzo ya que con su ayuda contribuyó a poder alcanzar esta meta.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por su ayuda desinteresada, en el desarrollo del proyecto de investigación.

De igual manera a mis amigos y compañeros de clases por hacer que el camino hacia esta tan preciada meta sea más fácil y llena de alegrías.

A los docentes miembros de mi tribunal el Ing. Ignacio Sotomayor, el Ing. David Campi y el Dr. Fernando Abasolo por su buena disposición al ayudarme en este proceso, por sus consejos, apoyo y sus conocimientos que conservaré siempre y pondré en práctica en mi vida personal y profesional.

DEDICATORIA

De manera muy humilde a mis amados padres, por su esfuerzo, amor, sacrificio y apoyo durante estos de estudios y así poder ser un profesional, este logro es para Fred Cruz y Nury Arévalo.

A todos mis familiares, tíos, primos, abuelos, a mis amados hermanos que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, brindándome su confianza y alegría, motivándome para poder superarme como profesional y como persona poder aportar algo positivo a la sociedad.

A mi abuelita Disnarda Vergara que siempre quiso ver este día, me apoyó y brindó su amor incondicional toda mi vida.

RESUMEN EJECUTIVO

El Ecuador posee diversidad de Musáceas, las cuales han sido diferenciadas a través de marcadores morfológicos, las cuales presentan ciertas limitantes ya que están sujetas a factores ambientales, como heliofanía, pluviosidad, altura sobre el nivel del mar, plagas y nuevas enfermedades, las cuales no permiten la especificidad de dicha técnica. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genética de *Musa acuminata* y *M. balbisiana* (bananos y plátanos), con el uso de RAPD's, las cuales se encuentran en el banco de germoplasma de la finca "La María" de la UTEQ. Para lo cual se ajustó un protocolo de extracción de ADN, su conservación es necesaria para continuar con investigaciones a nivel molecular. Los RAPD's demostraron ser una técnica precisa para diferenciar especies de genoma A o B y grados de disimilitud genética, donde se presentaron tres grupos, donde el Orito siendo diploide AA, se agrupó con Manzano AAB y Cuarofilos ABB similares genéticamente y diferenciados de los grupos que se unieron cultivares con genoma AAB (Grupo A), AAA (Grupo B). Para encontrar más diferencias entre especies se realizaron ensayos de caracteres fisiológicos como densidad estomática en la cutícula abaxial y adaxial y su posible relación con la resistencia o susceptibilidad a *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka Negra) de ciertos cultivares. Se desprendió la epidermis y se contaron el número de estomas en una cámara Newbauer con ayuda del Microscopio óptico con un aumento ocular de 10X y objetivo de 40X, los cuales presentaron relación indirecta ya que la resistencia se observa más en los cultivares de *M. balbisiana*. Los ensayos de cuantificación de clorofila determinaron que los bananos poseen cantidades significativas más altas de clorofila total 4,61 mg/g, lo que podría estar relacionado con la forma de consumo y el sabor dulce de sus frutos destacándose el Guineo Seda.

Palabras claves: *Musa acuminata*, *Musa balbisiana*, RAPD's, *Mycosphaerella fijiensis*, abaxial, adaxial, densidad estomática,

ABSTRAC

Ecuador has a diversity of Musaceas, which have been differentiated through morphological markers which present certain limitations as they are subject to environmental factors such as heliophania, rainfall, height above sea level, pests and new diseases. These do not allow the specificity of this technique. The objective of this work was to determine the genetic diversity of *Musa acuminata* and *Musa balbisiana* (bananas and plantains), with the use of RAPD's, which are found in the germplasm bank of farm "La María" of the UTEQ. For which a protocol of DNA extraction was adjusted, its conservation is necessary to continue with research at the molecular level. The RAPD's proved to be an accurate technique to differentiate species of genome A or B and degrees of genetic dissimilarity, where three groups were presented where the Orito being diploide AA was grouped with Manzano AAB and Cuarofilo ABB genetically similar and differentiated from the groups that AAB (Group A), AAA (Group B), genomes were bound. To find more differences between species, tests of physiological characters such as stomatal density in the abaxial and adaxial cuticle and their possible relationship with the resistance or susceptibility to *Mycosphaerella fijiensis* of certain cultivars were performed. The epidermis was removed and the number of stomata were counted in a Newbauer chamber with the help of the Optical Microscope with a 10X ocular increase and 40X objective, which were indirectly related since the resistance is observed more in the cultivars of *M. balbisiana*. The quantification tests of chlorophyll determined that bananas have higher amounts of total chlorophyll, this could be related to the form of consumption and the sweet taste of its fruits, highlighting the Guineo Seda.

Keywords: *Musa acuminata*, *Musa balbisiana*, RAPD's, *Mycosphaerella fijiensis*, abaxial, adalxial, stomatal density

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA.....	i
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y SESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO	iv
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO	viii
TABLA DE CONTENIDO	x
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiv
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
Código Dublín	xv
Introducción.....	1
 CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN	2
1.1. Problema de la investigación.....	3
1.1.1. Planteamiento del problema	3
1.1.2. Formulación del problema.....	3
1.1.3. Sistematización del problema.....	3
1.2. Objetivos.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. Justificación	5
 CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEORICA DE LA INVESTIGACIÓN	6
2.1. Marco Referencial	7
2.1.1. Origen e historia de las musáceas.....	7
2.1.2. Descripción taxonómica	8
2.1.3. Importancia de Bananos y Plátanos en el Ecuador.....	8

2.1.4.	Diferencia entre las especies	9
2.1.5.	Diversidad genética	9
2.1.6.	Biodiversidad de musáceas	10
2.1.7.	Descripción morfológica	11
2.1.7.1.	Tetraploides.....	11
2.1.7.2.	Triploides (AAB)	11
2.1.7.3.	Triploides (ABB)	14
2.1.7.4.	Triploides (AAA).....	14
2.1.7.5.	Diploide (AA)	16
2.1.8.	Marcadores morfológicos y moleculares para la identificación de diversidad genética.....	16
2.1.9.	Tipos de marcadores moleculares	17
2.1.9.1.	Marcadores de ADN	17
2.1.9.2.	Características, aplicaciones y antecedentes de marcadores moleculares en banano.....	18
2.1.9.3.	Análisis RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar)	19
2.1.9.4.	Ventajas y desventajas de los RAPD	19
2.1.10.	Reactivos utilizados como parte del tampón Buffer para la extracción de ADN	20
2.1.11.	Electroforesis	20
2.1.12.	Electroforesis en gel de agarosa.....	21
2.1.13.	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> (Sigatoka negra)	21
2.1.13.1.	Agente causal	22
2.1.14.	Clasificación bioquímica de <i>Musa</i> spp	22
2.1.15.	Estomas	22
2.1.16.	Clorofila	23
CAPÍTULO I I I. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		24
3.1.	Localización	25
3.2.	Tipo de investigación	25
3.3.	Método de Investigación	25
3.4.	Fuentes de recopilación de información	25
3.5.	Materiales.....	25

3.5.1.	Material genético.....	25
3.5.2.	Materiales y equipos	26
3.6.	Diseño de la investigación	28
3.6.1.	Diseño para el conteo de estomas	28
3.6.2.	Diseño para la cuantificación de clorofila.....	28
3.7.	Manejo del experimento.....	29
3.7.1.	Ajuste de un protocolo de extracción de ADN	29
3.7.2.	Análisis de ADN por electroforesis	30
3.7.3.	Selección de oligonucleótidos	30
3.7.4.	Reactivos para PCR-RAPD.....	31
3.7.5.	Programa de PCR.....	31
3.7.6.	Arbol filogenético	32
3.7.7.	Densidad estomática.....	32
3.7.8.	Cuantificación de clorofila	33
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		34
4.1.	Resultados	35
4.1.1.	Ajustar un protocolo de extracción de ADN.....	35
4.1.2.	Extracción de ADN genómico	36
4.1.3.	Selección de primers y obtención de bandas polimórficas por PCR-RAPD	36
4.1.4.	Agrupamiento de <i>Musa spp.</i> Para determinar diversidad genética	39
4.1.5.	Densidad estomática.....	40
4.1.5.1.	Densidad estomática abaxial.....	420
4.1.5.2.	Densidad estomática adaxial.....	42
4.1.6.	Clorofila Total	44
4.2.	Discusión.....	46
4.2.1.	Material Vegetal.....	46
4.2.2.	Extracción de ADN.....	46
4.2.3.	Análisis de Agrupamiento de <i>Musa spp.</i> para determinar diversidad genética	46
4.2.4.	Densidad estomática y relación con la resistencia a <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (Sigatoka negra).....	48
4.2.5.	Clorofila	49

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1. CONCLUSIONES	51
5.2. RECOMENDACIONES	52
CAPITULO VI BIBLIOGRAFÍA	53
6.1. Bibliografía.....	54
CAPITULO VII ANEXOS.....	58
7.1. Anexos.....	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Características generales de 17 cultivares de <i>Musa spp.</i> pertenecientes al banco de germoplasma de la Finca experimental “La María” de la UTEQ.	26
Cuadro 2	Cebadores utilizados para el análisis de polimorfismo RAPD's a los 17 cultivares de <i>Musa ssp</i> Oligonucleótidos decámeros.....	30
Cuadro 3	Componentes de la PCR.....	31
Cuadro 4	Programa de PCR-RAPD	31
Cuadro 5	Oligonucleótidos decámeros, bandas amplificadas, bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo entre los 17 cultivares de <i>Musa spp.</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Productos de extracción de ADN.....	36
Figura 2	Amplificación de marcadores RAPD producidos por la combinación OPC 15 y A 01.....	37
Figura 3	Amplificación de marcadores RAPD producidos por la combinación M 07 y OPA 10.....	38
Figura 4	Amplificación de marcadores RAPD producidos por la combinación OPA 15 y M 04.....	39

Figura 5	Árbol filogenético generado de los 17 cultivares de <i>Musa</i> spp.	40
Figura 6	Densidad estomática abaxial.....	41
Figura 7	Densidad estomática adaxial.....	43

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1	Densidad estomática abaxial.....	42
Grafico 2	Densidad estomática adaxial.....	44
Grafico 3	Cuantificación de clorofila total.....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Protocolo de extracción de ADN.....	59
Anexo 2	Preparación de la PCR-RAPD.....	60
Anexo 3	Productos de amplificación RAPD.....	60
Anexo 4	Metodología para cuantificación de estomas.....	61
Anexo 5	Metodología para cuantificación de clorofila.....	61

Código Dublín

Título:	“Diversidad genética de plantaciones de <i>Musa acuminata</i> y <i>Musa balbisiana</i> establecidas en el Ecuador utilizando RAPD’s”.		
Autor:	Cruz Arévalo Scott David		
Palabras clave:	<i>Musa acuminata</i> , <i>Musa balbisiana</i>	RAPD’s	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>
Fecha de publicación:			
Editorial:	Quevedo: UTEQ 2016		
Resumen: (hasta 300 palabras)	Resumen.- El Ecuador posee diversidad de Musáceas, las cuales han sido diferenciadas a través de marcadores morfológicos, las cuales presentan ciertas limitantes ya que están sujetas a factores ambientales, como heliofanía, pluviosidad, altura sobre el nivel del mar, plagas y nuevas enfermedades, las cuales no permiten la especificidad de dicha técnica. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genética de <i>Musa acuminata</i> y <i>M. balbisiana</i> (bananos y plátanos), con el uso de RAPD’s, las cuales se encuentran en el banco de germoplasma de la finca “La María” de la UTEQ. Para lo cual se ajustó un protocolo de extracción de ADN, su conservación es necesaria para continuar con investigaciones a nivel molecular. Los RAPD’s demostraron ser una técnica precisa para diferenciar especies de genoma A o B y grados de disimilitud genética, donde se presentaron tres grupos ,donde el Orito siendo diploide AA, se agrupó con Manzano AAB y Cuarofilos ABB similares genéticamente y diferenciados de los grupos que se unieron cultivares con genoma AAB (Grupo A), AAA (Grupo B). Para encontrar más diferencias entre especies se realizaron ensayos de caracteres fisiológicos como densidad estomática en la cutícula abaxial y adaxial y su posible relación con la resistencia o susceptibilidad a <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (Sigatoka Negra) de ciertos cultivares. Se desprendió la epidermis y se contaron el número de estomas en una cámara Newbauer con ayuda del Microscopio óptico con un aumento ocular de 10X y objetivo de 40X, los cuales presentaron relación indirecta ya que la resistencia se observa más en los cultivares de <i>M. balbisiana</i>. Los ensayos de cuantificación de clorofila determinaron que los bananos poseen cantidades significativas más altas de clorofila total 4,61 mg/g , lo que podría estar relacionado con la forma de consumo y el sabor dulce de sus frutos destacándose el Guineo Seda.		
Descripción:	Hojas : dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162		
URI:			

Introducción

El cultivo de banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) constituyen la actividad agrícola de mayor importancia para la economía del país. Durante el año 2016 el Ecuador exportó 5 millones 599 mil toneladas. Estos cultivos representan un importante sostén para la socioeconomía y seguridad alimentaria del país. Desde el punto de vista socioeconómico, el plátano genera fuentes estables y transitorias de trabajo (PROECUADOR, 2016).

La mayoría de cultivares de plátano y banano de la familia *Musaceae* tienen origen en dos especies silvestres: *M. acuminata* Colla y *M. balbisiana* Colla (Simmonds, 1966).

Cualquier grado de diferenciación en la secuencia de nucleótidos que conforman los genes de los organismos representa diversidad genética, otorgando la habilidad de las especies para adaptarse los cambios ambientales, plagas, entre otros (Romero, 2009). Además esto abarca poblaciones determinadas de la misma especie o la variación genética de una población. La función de la diversidad es la de mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio.

El uso de marcadores morfológicos posee muchas limitantes, ya que se sujeta a la variación del medio ambiente, debido a esto los clones presentan distinto comportamiento agronómico, e incluso algunas características como efecto indeseable. Con frecuencia este tipo de marcadores solo es posible analizarlos a nivel de toda la planta cuando esta llega a su madurez completa (Powell, 1992)

Es muy difícil estudiar la evolución, taxonomía y la magnitud de la diversidad genética en el género *Musa* por medio de marcadores morfológicos, fenológicos o florales, debido a la gran diversidad genética existente y el potencial de crecimiento. En los últimos años se han desarrollado técnicas bioquímicas y genéticas ‘*fingerprinting*’ para la identificación de clones de banano y se han creado excelentes perspectivas para nuevos cultivares

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN

1.1.Problema de la investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Estudiar la diversidad genética de bananos y plátanos de especies de *Musa* por medio de marcadores morfológicos, fenológicos o florales es muy limitada dado a la amplia diversidad genética existente y su potencial de incremento a través de la variación somaclonal, mutación inducida y transformación genética. Además dado al establecimiento del cultivo en zonas tropicales y subtropicales, este adopta comportamientos agronómicos según las condiciones agroecológicas del lugar, dificultando la exactitud de estas técnicas. Por ello el mejoramiento genético requiere métodos más precisos de identificación de cultivares y clones de bananos y plátanos.

1.1.2. Formulación del problema

¿De qué manera la técnica RAPD's muestra diversidad genética en *Musa acuminata* y *M. balbisiana*?

1.1.3. Sistematización del problema

Demostrar la diversidad genética de *Musa acuminata* y *M. balbisiana* estudiados con la técnica RAPD's

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Determinar la diversidad genética de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* con el uso de RAPD's

1.2.2. Objetivos específicos

- Ajustar una metodología de extracción de ADN genómico de cultivares de musáceas.
- Determinar el agrupamiento de musáceas sp. para su diversidad genética con el empleo de los RAPD's
- Determinar caracteres fisiológicos para estomas y contenido de clorofila en musáceas.

1.3. Justificación

El banano es considerado a nivel mundial uno de los cultivos comerciales de mayor importancia socio-económica ya que sus frutos constituyen un alimento básico para millones de personas y una fuente generadora de altos ingresos económicos (Bornacelly, 2009). Más de cuatrocientos millones de personas que habitan el trópico y subtrópico dependen del cultivo de las musáceas. Esto significa que para muchos países productores, este cultivo genera relevantes ingresos económicos ya sean comercializados en mercados locales o mercados de exportación Canále et,al. (2004).

El cultivo de banano (*Musa AAA*), constituye la actividad agrícola de mayor importancia para la economía del país, a su vez el cultivo de plátano (*Musa AAB*), representa un importante sostén para la socio-economía y seguridad alimentaria.

Los Marcadores bioquímicos y moleculares han creado excelentes perspectivas para identificar clones de banano permitiendo la identificación precisa de especies y cultivares, rutas evolutivas entre clones, identificación de duplicaciones de bancos de germoplasma establecidos en campo o por cultivo de tejidos, seguimiento de la estabilidad genética en materiales micro propagados con fines comerciales, identificación de marcadores claves para uso de programas de mejora y facilitar la protección legal de nuevos cultivares obtenidos (Robinson & Galán, 2011). Estos datos no se obtienen con tanta facilidad con los métodos tradicionales como los marcadores morfológicos, fenológicos, y florales, por lo que se requiere de métodos más precisos como los marcadores moleculares para tener mayor precisión en la clasificación de accesiones de *M. acuminata* y *M. balbisiana*.

Profundizar los conocimientos sobre la diversidad genética de las Musáceas, con técnicas más precisas como los marcadores moleculares abren las puertas a futuras investigaciones de mejoramiento genético, favoreciendo la calidad de futuros clones comerciales y contribuyendo a la economía del país y la seguridad alimentaria.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Referencial

2.1.1. Origen e historia de las musáceas

Los plátanos y bananos conocidos en la actualidad tuvieron su origen en las regiones de Sudeste Asiático y del Pacífico donde pueden encontrarse en el bosque de vegetación natural con ejemplares ancestrales diploides, no comestibles y con semillas. A lo largo de los años subespecies de diploides de *Musa acuminata* Colla se cruzaron de forma espontánea dando lugar a híbridos específicos algunos con genoma triploide, partenocárpico y poseían esterilidad femenina (Robinson & Galán, 2011).

Los diploides y triploides de *Musa acuminata* fueron llevados por el hombre a las áreas secas monzónicas de la India y Filipinas donde crecía otra especie *Musa balbisiana* de forma silvestre. La introducción de genes de *Musa balbisiana* procedentes de zonas secas y monzónicas y clones de *Musa acuminata* existentes en los trópicos húmedos del sudeste de Asia proporcionó a estos híbridos mayor nivel de endurecimiento y tolerancia a la sequía, resistencia a enfermedades, valor nutricional, entre otros, dando híbridos para consumo con previa cocción y apropiados para consumir como fruta fresca (Robinson & Galán, 2011).

La mayoría de cultivares de plátano y banano de la familia *Musaceae* tienen origen en dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla que por poliploidía e hibridación generaron las variedades cultivadas. Las composiciones ploidales y genómicas de los diferentes clones representan a *M. acuminata* y *M. balbisiana*, como A y B, respectivamente (Simmonds, 1966).

El cruzamiento natural entre estos diploides comestibles y los progenitores silvestres dio como resultado la formación de una progenie híbrida comestible y estéril con los genomas AB, AAA, AAB, ABB, AAAB, etc. Estos diferentes grupos genómicos juntos, constituyen la diversidad de los bananos comestibles en existencia actualmente (Devouard, 2001).

El género *Musa*, está constituido por dos grupos, series o secciones cada uno, cuyas diferencias, están basadas en el número de cromosomas, la forma y coloración de las brácteas y forma de las semillas (Devouard, 2001).

2.1.2. Descripción taxonómica

La familia musácea está constituida por plantas monocotiledóneas (clase Liliopsida), siendo una de las familias más grandes de las angiospermas. Se clasifica dentro del orden Zingiberales, el cual está constituido por seis familias de plantas perennes tropicales y subtropicales, las cuales varían en tamaño desde pocos centímetros hasta varios metros de altura. En el orden Zingiberales, además de las musáceas, se ubican a las familias Strelitziaceae (ej. *Heliconia* spp.), Zingiberaceae (ej. *Zingiber officinale* –jengibre). De todas estas familias, *Musaceae* es la más importante económicamente y está conformada por dos géneros: *Ensete* y *Musa* (Devouard, 2001).

El género *Musa* se divide en cuatro secciones: *Callimusa*, *Australimusa*, *Eumusa* y *Rhodochlamys*. Las especies en las secciones *Callimusa* y *Rhodochlamys* solo son de interés ornamental, ya que no producen frutas comestibles (Devouard, 2001).

Todas las variedades de banano y plátano cultivadas en la actualidad han surgido de las especies del grupo *Eumusa*. Esta sección es la de mayor difusión geográfica, con especies que crecen desde la India hasta el Pacífico. La sección contiene unas 11 especies, pero la mayoría de los cultivares proceden de solo dos: *M. acuminata* (genoma A) y *M. balbisiana* (genoma B). La posibilidad de consumir las frutas maduras de *M. acuminata* diploide (AA) ocurrió como resultado de mutaciones (INIBAP, 2001).

2.1.3. Importancia de Bananos y Plátanos en el Ecuador

Las musáceas se cultivan alrededor de 10 millones de hectáreas, principalmente por pequeños agricultores en países tropicales, constituyéndose en un rubro de importancia socio-económica, capaz de generar gran movimiento de divisas en los mercados nacionales e internacionales, y su importancia, no solo está basada en su uso como postre, con alto valor nutritivo y energético, sino también como viandas, que forman parte de la dieta humana. Son alimentos básicos para más de 400 millones de personas (Del Valle, 2006).

Debido a las condiciones climáticas favorables del Ecuador permite que cualquier tipo de productores puedan abastecer la demanda mundial los 365 días del año.

El cultivo de banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) constituyen la actividad agrícola de mayor importancia para la economía del país. Durante el año 2016 el Ecuador exportó 5 millones 599 mil toneladas. Un tercio de las exportaciones mundiales se origina en el Ecuador lo cual presenta actualmente un ingreso de \$2479483 equivalente al 3.39 % menor que el año 2015 (PROECUADOR, 2016)

Estos cultivos representan un importante sostén para la socioeconomía y seguridad alimentaria del país. Desde el punto de vista socioeconómico, el plátano genera fuentes estables y transitorias de trabajo (PROECUADOR, 2016).

2.1.4. Diferencia entre las especies

En razón de que existen quince caracteres taxonómicos que diferencian a *M. acuminata* de *Musa balbisiana*, se ha logrado clasificar cierto número de cultivares de plátanos. En esta clasificación el número básico de cromosomas es de 11. Los cultivares diploides contienen 22, con dos grupos definidos; los cultivares triploides presentan 33 cromosomas, con tres grupos. Con respecto a *M. balbisiana*, ninguno de estos cultivares corresponde fenotípicamente a esta especie. Las hojas de las plantas diploides por lo general son erectas, las de triploides son extendidas, y las correspondientes a tetraploides se arquean hacia abajo. Excepcionalmente, algunos triploides pueden tener hojas más erectas o arqueadas, como en el caso del plátano “Manzano” o “Silk” (Ploetz & Mourichon, 1999).

2.1.5. Diversidad genética

Cualquier grado de diferenciación en la secuencia de nucleótidos que conforman los genes de los organismos representa diversidad genética. Esto lo confiere a la habilidad de las especies para adaptarse a los cambios ambientales como nuevas plagas o cambios en las condiciones climáticas (Romero, 2009). Además esto abarca poblaciones determinadas de la misma especie o la variación genética de una población. La función de la diversidad genética (carga genética, expresada o no en los individuos de una especie) es la de mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio, que permita la

adaptación y supervivencia. Debido a ésto, la importancia de cualquier alteración en la diversidad genética es indirecta.

Las mutaciones son un proceso por el cual se originan cambios en el cromosoma, pueden ser por un cambio en el arreglo físico de los cromosomas o debido a una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN codificante, dando como resultado la creación de un nuevo carácter que está ausente en los progenitores (Romero, 2009).

En *Musa* debido a una mutación se produjo un cambio en la distribución de los cromosomas durante la gametogénesis, ocasionando que el progenitor ceda todos sus cromosomas no la mitad como sucede en los organismos que se reproducen sexualmente dando como resultado variedades triploides que desarrollaron partenocarpia vegetativa, se volvieron infértiles y adquirieron características diferentes a sus progenitores como frutos sin semillas y una gran cantidad de pulpa comestible (Romero, 2009).

2.1.6. Biodiversidad de Musáceas

En Ecuador se han identificado alrededor de veintiún cultivares de musáceas, de ellos se han realizado trabajos de investigación en base a descripción y comportamiento agronómico y ante patógenos de los siguientes cultivares: Dominico Hartón (AAB), Dominico (AAB), Dominico Gigante (AAB), Dominico Negro (AAB), Gros Michel (AAA), Guineo de Jardín (AAA), Filipino (AAA), Orito (AA), Maqueño morado (AAA), Maqueño verde (AAB), Limeño (AAB), Barraganete (AAB), Williams (AAA), Vines (AAAA), Curare (AAB), Cuatrofilos (ABB), Manzano (AAA), adaptados a temperaturas entre 23°C y 25°C llevados a cabo en la zona de Quevedo, El Carmen y la Maná (Guerrero, 2016).

2.1.7. Descripción Morfológica

2.1.7.1. Tetraploides

Dentro de este grupo se encuentran los híbridos mejorados del grupo FHIA estando a disposición de la comunidad internacional los híbridos FHIA-01, FHIA-02, FHIA-03, FHIA-17, FHIA-18, FHIA-20, FHIA-21, FHIA-23, FHIA-25. Su principal característica es la resistencia a varias enfermedades que en la actualidad devastan a las plantaciones de Musáceas como Sigatoka Negra, Mal de panamá y Moko (Aguilar, 2006).

- **Vinces (AAAA)**

Este cultivar posee hábito foliar normal, el color del pseudotallo es verde oscuro, la yema masculina es lanceolada. El racimo posee 190 dedos, cada fruto tiene una longitud de 22 cm (Guerrero, 2016).

2.1.7.2. Triploides (AAB)

- **Barraganete**

Cultivar con hábito foliar decumbente, el pseudotallo presenta coloración verde claro, la yema es lanceolada en etapa de floración y sus báctreas son agudas. El periodo de siembra a cosecha es de trece meses. El racimo posee un peso promedio de 16 kg, con 31 dedos por racimo. Cada fruto presenta una longitud de 32 cm con un diámetro de 17 cm (Paéz, 2012).

Respecto al ataque de plagas y enfermedades el barraganete es muy susceptible al ataque de *Radopholus similis* y *Meloidogyne* (López, 2015). Además ante el ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, este cultivar es medianamente resistente (Cedeño, 2010).

- **Dominico**

Los Dominicos presentan hábito foliar normal, la coloración que presenta el pseudotallo es verde rojizo. El periodo de siembra a cosecha es de trece meses y la etapa de floración empieza a los diez meses de edad. El racimo posee un peso promedio de 21 kg,

conformado por 8 a 9 manos. Los frutos presentan una longitud promedio de 29 cm con un diámetro de 15 cm aproximadamente (Paéz, 2012).

El Dominico es susceptible al nematodos *Meloidogyne* y con mayor susceptibilidad a *Radopholus similis* (López, 2015). Ante *Mycosphaerella fijiensis* agente causal de Sigatoka negra este cultivar presenta resistencia a esta enfermedad (Cedeño, 2010).

- **Dominico Hartón**

Este cultivar presenta frutos similares a los de Barraganete, mas la conformación del racimo es similar a la del Dominico. Es muy inestable genéticamente, ya que en la segunda o tercera generación muchos de ellos se vuelven tipo Dominico o Barraganete. Hasta la quinta mano presenta doble hilera de frutos, de ahí en adelante solo presenta una hilera de frutos (Cedeño, 2010).

Paéz (2012), describe que el pseudotallo de esta variedad, presenta una coloración verde rojiza. El periodo de siembra es de trece meses y la floración se presenta a los 9 meses de edad del cultivo. Los frutos presentan un peso promedio de 9 kg, conformado por 8 manos, teniendo los frutos 35 cm de longitud y un diámetro de 16 centímetros.

Esta variedad presenta resistencia al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, debido a que el patógeno no puede ploriferar, lo que impide que este cause daño al cultivo (Cedeño, 2010). A su vez se ve muy afectada por los nematodos, ya que es muy susceptible al ataque de *Radopholus similis* y *Meloidogyne* (López, 2015).

- **Dominico negro**

Este cultivar se diferencia del Dominico verde por su coloración azul del pseudotallo. El racimo se posiciona en forma pendular verticalmente. El racimo posee un peso promedio de 20 kg, 145 dedos, como referencia en la mano media del racimo, la longitud promedio del fruto es de 29 cm y un perímetro de 15 cm (Paéz, 2012). Referente al ataque de patógenos este cultivar es susceptible a *Radopholus similis* y *Meloidogyne* (López, 2015), mientras que presenta mediana resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* (Cedeño, 2010).

- **Dominico Gigante**

Esta variedad se diferencia al Dominico común, por presentar mayor altura, mayor vigor y un pseudotallo más robusto. La coloración del pseudotallo es verde (Cedeño, 2010). El racimo puede presentar hasta 24 manos (López, 2015).

Este cultivar presenta cierta susceptibilidad al ataque de *Radopholus similis* y *Meloidogyne* (López, 2015), mientras es medianamente resistente al ataque de hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Paéz, 2012).

- **Maqueño verde**

Esta variedad en muchas ocasiones alcanza alturas superiores a los cuatro metros. El pseudotallo es de color morado, igual sus nervaduras. El racimo es color verde a diferencia del Maqueño morado con el que comparte caracteres similares. El uso a nivel local es limitado a la alimentación de animales y su pariente cercano Maqueño morado se exporta en pequeñas cantidades. El maqueño verde presenta resistencia moderada ante el ataque de *Mycosphaerella fijiensis* (Moreira, 2015).

- **Limeño**

Este cultivar presenta coloración rojiza, El racimo se presenta en posición pendular verticalmente, la yema tiene forma de trompo, el ápice de la bráctea es de forma intermedia. El racimo es parecido al de orito con un peso de 25 kg. Posee un número de manos de 8, un fruto de 23 cm de longitud con un diámetro de 16 cm. La pulpa es de color rosáceo y suave y se consume en preparados cocidos (Guerrero, 2016).

Este cultivar es susceptible al ataque de *Radopholus similis* y *Meloidogyne* (López, 2015). Es resistente al ataque de *Mycosphaerella fijiensis* (Cedeño, 2010).

- **Manzano**

Este cultivar presenta un color del pseudotallo rosa azulado claro, es de hábito foliar normal, la yema masculina es normal. Posee 88 dedos por racimo, con una longitud de 16 cm (Guerrero, 2016).

2.1.7.3. Triploides (ABB)

- **Cuatrofilos**

Esta variedad se caracteriza por tener robustez y gran capacidad de macollamiento, esto aun en condiciones de baja fertilidad del suelo. Es resistente al hongo *Mycosphaerella fijiensis* y nematodos. Los frutos son gruesos y cortos con cuatro aristas bien pronunciados, por la cual se origina su denominación (Tazan, 2003).

2.1.7.4. Triploides (AAA)

- **Guineo Seda**

Paéz (2012) determinó que esta variedad que posee hábito foliar decumbente. La coloración del pseudotallo es verde medio. El peso promedio del racimo es de 24 kg, posee 11, la longitud del fruto es de 26 cm y 14 cm del perímetro de fruto. La maduración es regular y homogénea, textura delicada y sabor delicioso debido a esto se lo conoce con el nombre de: “GUINEO DE SEDA” o “PLATANO DE SEDA” siendo muy susceptible a la enfermedad denominada “Mal de Panamá” causado por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Cedeño, 2010). Este cultivar es moderadamente resistente a *Radopholus similis* y *Meloidogyne* (López, 2015) y muy susceptible al ataque de *Mycosphaerella fijiensis* (Cedeño, 2010).

- **Williams**

Este cultivar presenta alta producción de frutos de buena calidad. Es una planta semi-enana de pseudotallo vigoroso y coloración verde amarillento. Gracias a su sistema radicular presenta resistencia al volcamiento por vientos. En cuanto a la producción, su racimo presenta un peso promedio de 26 kg, posee 12 manos, con una longitud de 23 y 13 cm de perímetro de la fruta respectivamente. Esta variedad se destaca por tener una mayor adaptabilidad a condiciones extremas de clima, suelo y agua (Guerrero, 2016).

Referente al ataque de patógenos es muy susceptible al nematodo *Radopholus similis* mientras que es resistente a *Meloidogyne* (López, 2015). Es susceptible al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra).

- **Filipino**

Este cultivar posee un hábito foliar normal, debido a su gran altura presenta alta susceptibilidad al volcamiento. Presenta un peso de 33 kg del racimo, los frutos alcanzan longitudes entre 22 y 27 cm con un perímetro de 14 cm. El fruto tiene la tendencia a ser más curvos que los del grupo Cavendish, poseyendo una curva bien marcada. La sección transversal del fruto tiene bordes débilmente pronunciados con un ápice truncado, además su maduración es lenta y su pulpa es dulce (Paéz, 2012).

Este cultivar es susceptible a las enfermedades fungosas como Sigatoka negra y Mal de Panamá.

- **Maqueño morado**

El pseudotallo es similar al color morado, con una altura que fluctúa entre los 3,5 y 4,0 metros. El ciclo vegetativo es muy prolongado entre 15 a 18 meses en estudios realizados en Santo Domingo y la Maná, la disposición foliar horizontal, frutos de poca longitud y gruesos de color morado (Véliz, 2011).

- **Guineo de jardín**

Posee un gran parecido al clon Enano Cavendish (Dwarf Cavendish), tiene un hábito foliar decumbente, el pseudotallo presenta una coloración verde medio, el racimo se presenta pendular verticalmente, la forma de la yema masculina es lanceolada y del ápice y a bráctea medio puntiagudo. Esta variedad puede presentar una altura de aproximadamente 2 metros. El racimo llega a pesar 19 kg con unos frutos de 21 a 25 cm de longitud y un diámetro de 12 cm. La forma del fruto es curva, con bordes pronunciados y una sección transversal y el ápice es truncado. Su uso en la mayoría de las ocasiones es ornamental de ahí su nombre (Guerrero, 2016).

En cuanto al ataque de patógenos es altamente susceptible a *Radopholus similis* mientras que es medianamente resistente a *Meloidogyne* (López, 2015). Ante la inoculación del hongo *Mycosphaerella fijiensis* este cultivar es muy susceptible (Paéz, 2012).

2.1.7.5. Diploide (AA)

- **Orito**

Es una planta robusta de hábito foliar erecto, puede alcanzar más de 4 metros de altura. El pseudotallo es de color verde amarillento y su yema masculina tiene forma intermedia. Posee brácteas puntiagudas en el ápice. Soporta muy bien la acción del viento por su eficiente sistema radicular. El racimo presenta una ligera inclinación, siendo su peso de 11 kg con aproximadamente siete manos. La longitud del fruto y diámetro es de 13 cm. Los racimos son pequeños con gran número de dedos cortos, gruesos y rectos. Su pulpa es amarilla, suave pastosa, muy dulce y con mucho aroma. Además presenta mayor contenido vitamínico que otros cultivares (Cedeño, 2010).

Esta variedad es medianamente resistente a *Radopholus similis* y *Meloidogyne* (López, 2015). a su vez resistente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

2.1.8. Marcadores morfológicos y moleculares para la identificación de diversidad genética

El uso de marcadores morfológicos posee muchas limitantes, debido a que su expresión se sujeta a la variación del medio ambiente, e incluso, algunas características tienen efecto indeseable. Con frecuencia este tipo de marcadores solo es posible de analizarlos a nivel de toda la planta cuando esta llega a su madurez completa (Powell, 1992).

Los marcadores morfológicos para la clasificación de los clones de banano y plátano son los siguientes: color del pseudotallo, canal peciolar, pedúnculo, pedicelos, rudimentos seminales, hombros de bráctea, forma de la bráctea, ápice de la bráctea, color de la bráctea, atenuación del color, cicatrices, sépalo libre de la flor, color de la flor masculina o estaminada, color del estigma (Simmonds & Shepherd, 1955).

A diferencia de los marcadores morfológicos, los marcadores moleculares presentan una mayor segregación o polimorfismo y son fenotípicamente neutros, se pueden evaluar en los primeros estados de desarrollo de la planta utilizando toda o parte de ella. Aparentemente

está libre de efectos epistáticos y virtualmente se pueden evaluar un número limitado de ellos (Powell, 1992).

Es muy difícil estudiar la evolución, taxonomía y la magnitud de la diversidad genética en el género *Musa* por medio de marcadores morfológicos, fenológicos o florales, ya que la gran diversidad genética existente y el potencial de crecimiento a través de la variación somaclonal, mutación inducida y transformación genética requiere técnicas más precisas para la identificación de clones de bananas y plátanos. En los últimos años se han desarrollado técnicas bioquímicas y genéticas '*fingerprinting*' para la identificación de clones de banana y se han creado excelentes perspectivas para nuevos cultivares. Estas técnicas permitirán la identificación precisa de los cultivares, la determinación de rutas evolutivas entre clones, la identificación de duplicaciones entre accesiones de los bancos de germoplasma establecidos en campo o por cultivo de tejidos, el seguimiento de la estabilidad genética en material micropropagado para uso comercial, y la identificación de marcadores claves para el uso de programa de mejoras. Otra ventaja de los fingerprinting es su utilidad para el patentado de plantas y para facilitar la protección legal de los nuevos cultivares obtenidos por mejora (Robinson & Galán, 2011).

2.1.9. Tipos de marcadores moleculares

2.1.9.1. Marcadores de ADN

Estos solucionaron el problema de la carencia de marcadores que tenían la isoenzimas debido a que son capaces de generar una cantidad virtualmente indeterminada de ellos. Dentro del grupo de marcadores moleculares se encuentran RFLP (Polimorfismo del tamaño de fragmentos de restricción), los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con primado arbitrario (AP-PCR) que genera los RAPD (ADN polimórfico amplificado arbitrariamente) y los microsatélites (Carranza, 2007).

2.1.9.2. Características, aplicaciones y antecedentes de marcadores moleculares en banano

Uno de los atributos que debe tener un gen marcador es el polimorfismo, el carácter hereditario, insensibilidad a la influencia y efectos del ambiente, fáciles de expresar, identificar y analizar. Los RAPDs son fáciles de analizar, una vez extraído el ADN se necesita de 4-6 horas para amplificación mediante PCR y separación electroforética de igual forma lo RFLPs pueden cubrir densamente el genoma, Los RAPDs poseen el inconveniente de solo detectar un alelo, mientras que las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente con un alelo nulo, por lo que no es posible distinguir el genotipo homocigótico dominante y heterocigótico. Esta distinción es imprescindible para realizar la separación de individuos de la generación F2 (Arus & Moreno, 1993).

El análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) por sus siglas en ingles es una técnica de *fingerprinting* del ADN muy útil para detectar las relaciones cenrcanas entre accesiones de similar genoma y nivel de ploidía (Robinson & Galán, 2011). Los trabajos realizados por Kaemmer et al. (1992) permitieron la introducción de dos nuevas técnicas *fingerprinting* del ADN estas permiten detectar las diferencias entre los distintos clones existentes dentro de cada uno de los genomas AAA, AAAA, AAB y ABB. Una de estas técnicas de oligonucleótidos, reconoce las secuencias simples repetitivas del ADN que son polimórficas en los genomas de las plantas.

La otra técnica llamada análisis de reacciones de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD) o, aleatoriamente, reacción de la cadena de polimerasa con cebado aleatorio (AP-PCR), se basa en la amplificación aleatoria medida por PCR de fragmentos de ADN pudiendo se polimórficos o no. Se ha demostrado que estas técnicas son somáticamente estables y no mostraron diferencias entre plantas de ‘Gran Enana’, pero si bandas características de genoma A y B y también pueden distinguir entre formas originales y formas mutantes de ‘Gran Enana’ (Robinson & Galán, 2011).

Los RFLP de germoplasma disperso son útiles para estudiar filogenia y taxonomía de especies de *Musas*, aunque no adecuados para detectar entre materiales más próximamente relacionados, para ello son más apropiados PCR y RAPD. Usar marcadores RAPD también

puede ser de gran valor para detectar de forma precoz mutantes somaclonales enanos o variegados inducidos en el proceso de micropropagación (Zaffary & Kerbauy, 2006).

2.1.9.3. Análisis RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar)

El análisis RAPD o Random Amplified Polymorphic DNA (ADN polimórfico amplificado al azar) Williams (1990) y Mc Clelland (1990) lo describieron por primera vez. Es en esencia la misma metodología PCR pero con primario arbitrario por eso a veces se la conoce con el nombre de AP- PCR. La modificación que dio su origen fue simple, consistió sustituir en la metodología PCR, el uso de un par de cebadores un poco largos cuidadosamente diseñados por un solo “indicador” o cebador corto dando la capacidad de unirse a muchos locus diferentes (Waugh & Powell, 1992).

Los polimorfismos que se producen son denominados marcadores RAPD, pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión de “cebador” (mutación puntual), lo que impide que el indicador se una a la cadena, o a su vez pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde. Los fragmentos amplificados pueden ser visualizados a través de un gel de electroforesis previo a la coloración específica con bromuro de etidio y luz ultravioleta (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.1.9.4. Ventajas y desventajas de los RAPD

Las ventajas de los RAPD es que generan un gran número de marcadores, no requieren el desarrollo de sondas específicas para cada especie, ni tampoco el uso de sustancias radiactivas. Las cantidades de ADN requeridas son cien veces inferiores que las usadas en los RFLPs, el costo de la técnica RAPDS es más bajo que el de RFLP debido a que los reactivos y la mano de obra es menos, no se requiere tener experiencia profunda en biología molecular. Por dicha razón se la puede analizar de forma más rápida y con menos restricciones de laboratorio, por ello se la simplifica en dos grandes atributos: simplicidad y rapidez (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Algunas de las desventajas de esta técnica es el bajo contenido de información genética por locus algunas bandas no pueden detectar con facilidad y su costo está por encima de las isoenzimas y por debajo de los RFLP (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.1.10. Reactivos utilizados como parte del tampón buffer para la extracción de ADN

a. Tris (Hidroximetil amino metano).- Es un tampón biológico, cuya función es mantener el pH de la solución constante (pH 7.0 pH 8.0). Se prepara a pH 8.0. El peso molecular del TRIS es 124.14 g. / grmol. Preparando 100 ml de solución madre de tris de concentración 1M (Velasco Mosquera, 2005).

b. EDTA (Ácido etilen diamino tetra acético).- Es un agente quelante de iones metálicos como Ca^{++} y Mg^{++} . Inhibe la acción de las nucleasas al no haber cofactores libres para su actividad y así protege al ADN. Se prepara a pH 8.0. El peso molecular del EDTA es 372.24 g. / grmol. Preparando 100 ml de solución madre de EDTA de concentración 0.5 M (Velasco Mosquera, 2005).

c. NaCl (Cloruro de sodio).- Las sales aumentan el poder iónico de la solución y ocasionan la precipitación del ADN. El peso molecular del NaCl es 58.44 g. / mol. Preparando 100 ml de solución madre de NaCl de concentración 5 M (Velasco Mosquera, 2005).

d. CTAB (Cetil trimetil amonio bromuro).- Es un detergente catiónico fácilmente removible por dilución, que permite la solubilización de compuestos de tipo polisacáridos (González, 1995).

2.1.11. Electroforesis

La electroforesis es una técnica aplicada para la separación de moléculas según la movilidad de éstas a través de una matriz porosa en un campo eléctrico, las cuales se separan por tamaños moleculares y carga eléctrica, dependiendo de la técnica empleada. La técnica clásica utiliza una tira recubierta de una sustancia porosa impregnada a un electrolito. Sus extremos se sumergen en dos depósitos independientes, que contienen dos

electrolitos y están unidos a los electrodos del generador de corriente. Las muestras se depositan en un trazo transversal en la tiras. La distancia de migración se mide en relación de un marcador interno (Morales Becerril, 2008).

2.1.12. Electroforesis en gel de agarosa

Este es el método convencional para la separación de moléculas de ADN de diferentes longitudes. Tiene muchas aplicaciones en el análisis del tamaño de los fragmentos de ADN, además se la puede utilizar para separar moléculas de ARN (Brown, 2008).

La Electroforesis se define como el movimiento de las moléculas con carga en un campo eléctrico; las moléculas con cargas negativas migran hacia el electro positivo y viceversa. Un gel de agarosa se prepara mezclando la cantidad apropiada de polvo con una solución de sustancia amortiguadora, se calienta hasta disolver la agarosa, después vertiendo el gel líquido sobre una placa (Brown, 2008).

2.1.13. Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*)

La sigatoka negra es una enfermedad deterioradora del área foliar de la planta, como consecuencia retrasa la floración y la cosecha, reduce el llenado del racimo y la vida verde de la fruta (Lepoivre, 2003). A diferencia de la respiración, la tasa de fotosíntesis aparente generalmente decrece en las hojas infectadas (Belalcázar & Merchán, 1991). Las esporas de *M. fijiensis* especialmente germinan sobre la superficie abaxial de las hojas, penetrando con sus hifas los aberturas estomáticas iniciando con ello un proceso rápido de colonización del mesófilo foliar de los genotipos susceptibles. El proceso fotosintético se ve comprometido con la penetración mecánica por parte del hongo, reduciendo la conductividad estomática de la cual depende la tasa fotosintética (Belalcázar & Merchán, 1991). Esta es la vía de entrada de *M. fijiensis* a las hojas y ocurre incluso en los cultivares que muestran alta resistencia a esta enfermedad (Lepoivre, 2003).

En las enfermedades foliares pueden ser afectados cada uno de los procesos que gobiernan el flujo de carbono vegetal como la fotosíntesis, respiración y transporte, con el resultado final de favorecer la economía del carbono del parásito involucrado (Daly, 1976).

2.1.13.1. Agente causal

El agente causal de la Sigatoka Negra de bananos y plátanos *Musa spp.* en su ciclo de vida presenta un estado perfecto conocida como fase ascógena o sexual y un estado imperfecto que es la fase conídica o asexual. *M. fijiensis* es el estado perfecto y pertenece a la clase Ascomycete; *Pseudocercospora fijiensis*, es el estado imperfecto y pertenece a la clase Hyphomycetae (Orozco, Rodríguez, & James, 2005).

2.1.14. Clasificación bioquímica de *Musa spp*

De acuerdo con el manejo particular del CO₂ las *Musaceas* se clasifican en el grupo de las plantas C-3, o sea el primer compuesto fijado por la fotosíntesis tiene tres carbonos, En las especies C-4, la vía de Hatch Slack, muestra un grado bajo de actividad. Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa, está involucrada en la carbonización primaria es también oxigenasa. Conforme aumenta la concentración de oxígeno, una porción creciente del CO₂ fijado se canaliza por la vía de glioxilato, proporcionando sustratos para la fotorespiración y otras síntesis. Entre un 20 y un 50% de carbono fijado se respira inmediatamente (Salisbury & Ross, 1994).

En comunidades de plantas como las Musáceas, la fotosíntesis se lleva a cabo en estratos de hojas que se superponen sombreándose unas a otras. De esta manera la radiación incidente es absorbida a medida que atraviesa las capas de hojas, aprovechando la mayor parte de ellas Barrera et al. (2011).

2.1.15. Estomas

Los estomas son la solución a la barrera que impide la deshidratación de las plantas, estas aberturas resuelven el dilema de la regulación temporal del intercambio de O₂ y CO₂, esenciales para la respiración y fotosíntesis (Sánchez & Aguirreolea, 2013).

La apertura estomática es fundamental para el intercambio gaseoso y, por consiguiente, para la difusión del CO₂. La intensidad lumínica requerida para banano se ha estimado en 220 u moles de m⁻² s⁻¹ en el haz y 572 u moles de m⁻² s⁻¹, en el envés; se estima un

comportamiento similar en plátano. Las plantas presentan un mayor número de estomas por el envés de (158 estomas mm^{-2}), en relación 4:1 con el haz; no todos los estomas al llegar al punto de saturación de luz se cierran, ya que la planta cuenta con mecanismos para permitir el intercambio gaseoso. La principal fuente de energía que utilizan las plantas verdes, es la radiación solar, comprendida entre 0.4 y 0.7 μm del espectro de luz. La calidad y duración de ésta, depende de factores como altitud, nubosidad, polvo, coberturas vegetales y la latitud, respectivamente (Brun, 1961).

La capacidad de las plantas para transformar esta energía, también depende de otros factores como el área foliar, estado sanitario, ángulo de inserción y forma de la hoja que influye en el aprovechamiento de la luz (Barrera, Cardona, & Cayón, 2011)

2.1.16. Clorofila

En las plantas, la luz destinada a impulsar el proceso fotosintético es absorbida por dos tipos principales de pigmentos: clorofilas y carotenoides, que son moléculas cromóforas sensibles a la radiación luminosa y genéricamente llamadas pigmentos fotosintéticos. Estos pigmentos no están libres en el aparato fotosintético, sino que se encuentran engarzados dentro de las proteínas fotosintéticas formando los complejos pigmentoproteína. (De las Rivas, 2013).

En comunidades de plátano, la fotosíntesis se lleva a cabo en estratos acumulados de hojas que se superponen sombreándose unas a otras. De esta manera, la luz incidente es absorbida a medida que atraviesa las capas de hojas, aprovechando la mayor parte de ella. (Barrera, Cardona, & Cayón, 2011).

El contenido de clorofila aumenta con incrementos en la densidad de siembra, como respuesta de la planta para compensar la falta de luz y maximizar la captación de energía; también se observó en campo que las plantas, en sistemas agroforestales, el color verde de sus hojas es más intenso que las plantas de mono cultivo y de exposición plena. (Belalcázar & Merchán, 1991)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

La presente investigación se realizó en el laboratorio de biotecnología perteneciente a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo ubicada en el Km. 1.1/2 vía Quevedo - Santo Domingo de los Tsachilas. Las respectivas coordenadas geográficas son 01° 01" de latitud sur y 79° 47" de longitud occidental, ubicada a una altura de 73 metros sobre el nivel del mar

3.2. Tipo de investigación

Se empleó el método experimental, realizando comparaciones con la literatura existente y ensayos sobre diversidad genética utilizando RAPD, con los resultados obtenidos se espera demostrar polimorfismo en las cadenas de ADN de las accesiones de *Musaceas*

3.3. Método de investigación

Se aplicaron métodos deductivos, analítico y observativos teniendo en cuenta la literatura citada en este proyecto.

3.4. Fuentes de recopilación de información

Las fuentes usadas para la obtención de información fueron secundarias debido a que se obtuvieron de revistas, publicaciones científicas, libros e internet.

3.5. Materiales

3.5.1. Material genético

Las hojas de los cultivares de *M. acuminata* y *M. balbisiana* fueron recolectadas y seleccionadas en la Facultad de Ciencias Pecuarias, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Campus Finca Experimental "La María", km 7 vía Quevedo-El Empalme. C. P. 73. Mocache, Los Ríos, Ecuador

En el cuadro 1 se presentan las características de los cultivares de *Musa spp.* pertenecientes al banco de germoplasma de la UTEQ.

Cuadro 1. Características generales de 17 cultivares de *Musa spp.* pertenecientes al banco de germoplasma de la Finca Experimental “La María”, UTEQ.

Nombre común	Subgrupo	Genoma	Forma de consumo
Guineo de Jardín	“Cavendish”	AAA	Ps
Filipino	“Cavendish”	AAA	Ps
Williams	“Cavendish”	AAA	Ps
Orito	Sucrier	AA	Ps
Guineo de Seda	Gros Michel	AAA	Ps
Vinces		AAAA	Ps
Manzano		AAB	Ps
Dominico gigante	Plantain tipo French	AAB	Coc
Dominico	Plantain tipo French	AAB	Coc
Dominico negro	Plantain tipo French	AAB	Coc
Dominico Hartón	Plantain tipo French	AAB	Coc
Barraganete		AAB	Coc
Limeño	Plantain tipo Iholena	AAB	Coc
Maqueño verde		AAB	Coc
Maqueño morado	Plantain tipo Maia Maoli	AAA	Ps
Curare		AAB	Coc
Cuatrofiloss		ABB	Coc

Ps= Postre; Coc = Cocción

3.5.2. Materiales y Equipos

Material de laboratorio

- Puntas amarillas 5-200 ul. Pk/1000
- Guantes de nitrilo
- Papel toalla
- Microtubos 1.5 ml. Pk/1000
- Puntas azules 1000 ul. Pk/1000
- Tubo PCR individual 0.2 ml. Cs/1000.

- Mascarillas
- Guantes quirúrgicos talla S
- Tubos vacutainer
- Vasos de precipitación
- Papel Parafil
- Micropipetas

Material de oficina

- Cuaderno
- Computador
- Lapiceros
- USB pendrive

Equipos de laboratorio

- Nevera
- Balanza 0.001 g
- Kit de purificación de agua millipore
- Termociclador
- Espectofotómetro
- Campana extractora de gases
- Cámara fotográfica
- UV transiluminador
- Baño María
- Centrífuga
- Congelador
- Vortex
- Potenciómetro
- Caja electroforética
- Microondas
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Agitador – Calentador

- Destilador de agua
- Rejillas
- Separadores
- Tijeras

Reactivos

- 2-Mercaptoethanol (100 X) liquid
- Nitrógeno líquido
- 10 x Blue juice buffer
- Agarose ultrapura
- Agua ultra pura
- Tris base
- Alcohol isoamilico
- Isopropanol
- Ethanol absoluto
- Cloruro de sodio
- Bromuro de etidio
- Taq DNA polymerase
- Cloruro de amonio

3.6. Diseño de la Investigación

3.6.1. Diseño para el conteo de estomas

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para estudiar la densidad estomática abaxial y adaxial en los cultivares de *Musáceas*, con 17 tratamientos y cuatro repeticiones.

3.6.2. Diseño para la cuantificación de clorofila

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para estudiar el contenido de clorofila total en los cultivares de *Musáceas*, con 17 tratamientos y tres repeticiones

Las variables evaluadas fueron sometidas al análisis de varianza y se empleó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer diferencias entre las medias de los tratamientos. Se utilizó InfoStat para el correspondiente proceso estadístico,

3.7. Manejos del experimento

3.7.1. Ajuste de un protocolo de extracción de ADN

Se seleccionó el Protocolo propuesto por EMBRAPA (2010) modificado por Romero (2011) ver (Anexo 1)

1. Se pesó 1g. de hoja y ubicado en el mortero, macerado con 700 uL del tampon buffer (2 ml. de CTAB 1%, 2,8 ml. NaCl 1,4M, 1 ml. Tris-HCl 100 mM. pH 8.0; 0,4 ml. EDTA 20 mM., 0,1 g. PVP uL β -mercaptoetanol 0,1% y 3,7 ml. agua destilada).
2. El producto de maceración se transfirió a microtubos de 2 ml. y se adicionó 500 ul del tampon buffer (2 ml. de CTAB 1%, 2,8 ml. NaCl 1,4M, 1 ml. Tris-HCl 100 mM. pH 8.0; 0,4 ml. EDTA 20 mM., 0,1 g. PVP uL β -mercaptoetanol 0,1% y 3,7 ml. agua destilada).
3. Las muestras se incubaron en baño maría a 65°C durante 60 min. agitando suavemente cada 15 minutos.
4. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. y transfiriendo la fase acuosa a un microtubo nuevo.
5. Se adicionó igual volumen del tampon Cloroformo isoamilalcohol CIA (24:1), agitando por inversión durante 5 minutos.
6. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos y se transfirió la fase superior a un nuevo microtubo.
7. Se adicionó CIA en igual volumen y se mezcló por inversión durante 5 min.; se centrifugó por 15 minutos a 12000 revoluciones por minuto.
8. Se transfirió a un tubo nuevo para la precipitación de los ácidos nucleicos adicionando 2/3 del volumen de isopropanol helado. Se dejó reposar 3h a 20°C.

9. Se centrifugó por 10 min. a 12000rpm. y se retiró el isopropanol, después se realizaron dos lavados al pellet con 500 uL de etanol 70 %, centrifugando por 5 minutos.
10. Se descartó el etanol y se secó en la estufa a 37°C por 30 min.
11. Posteriormente se resuspendieron los ADN's en 100ul de TE 1X pH 8.0.

3.7.2. Análisis de ADN por electroforesis

Una vez las muestras extraídas los productos de ADN genómico de los 17 cultivars fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa a 1 %, conteniendo bromuro de etidio. Para cada producto de extracción se utilizó 4 ul de ADN más 2 ul de buffer de muestra 10X Blu Juice (Invitrogen).

El producto se migró en una unidad de electroforesis horizontal con tampón TAE 1X (Bufer Tris, Ácido acético, EDTA) a 90 voltios por 10 minutos. Después se analizó el ADN en un transiluminador (FBTI-88 Fisher Scientific). Al comprobar que la extracción se realizó las imágenes fueron capturadas por un equipo foto documentador (Life Technologies) que dispone de luz UV y una cámara de alta resolución

3.7.3. Selección de oligonucleótidos

Se utilizaron los oligonucleótidos decámeros de que presentaron mayor polimorfismo en estudios realizados para Musáceas, utilizados por Nadal et al., (2009). Se consideraron las cinco combinaciones de oligonucleótidos que presentaron mayor número de bandas polimórficas. Las secuencias se presentan a continuación:

Cuadro 2. Cebadores utilizados para el análisis de polimorfismo RAPD's a los 17 cultivares de *Musa* spp. oligonucleótidos decámeros.

Código	Secuencia
M 07	5'-CCGTGACTCA-3'
A 01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA 04	5'-AATCGGGCTG-3'
PLAT	5'-GACAGACAGA-3'
OPA 10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPC15	5'-GACGGATCAG-3'
M 04	5'-GGCGGTTGTC-3'

3.7.4. Reactivos para PCR-RAPD

En el cuadro 3 los componentes para el mix de la PCR, los que se realizaron en un volumen total de 20 ul: 4 ul de buffer 5x Cl₂Mg 50 mM., 1 ul de DNTP 10mM; 0,2 ul de TAQ pol; 1 ul de los iniciadores forward y reverse, respectivamente y 10,8 ul de agua ultrapura. Se utilizaron los reactivos de PROMEGA.

Cuadro 3. Componentes de la PCR

Reactivo	Cantidad
H ₂ O	10,8 ul
Combinación de Iniciadores (2)	1-1 ul
Buffer 5x Mg Cl ₂	4 ul
dNTPs Mix 10x	1 ul
Taq Polimerasa	0,2 ul
ADN Genómico	2 ul
Volumen total	20 ul

3.7.5. Programa de PCR

Las condiciones de amplificación de la PCR fueron aquellas establecidas por Canchignia et.al. (2006) las cuales se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Programa de PCR-RAPD.

Etapa	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Predesnaturalización	3 minutos	94 °C	1
Desnaturalización	1 minuto	94 °C	40
Alineamiento de iniciadores	2 minutos	37 °C	40
Polimerización	2 minutos	72 °C	40
Extensión final	7 minutos	72 °C	1
Polimerización	5 minutos	4 °C	1

Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel de Agarosa al 2,5%, teñido con bromuro de etidio, con un voltaje de 70, por 2 horas 30 minutos y fotografiadas con una cámara digital de luz UV (Life Technologies)

3.7.6. Árbol filogenético

La historia evolutiva fue inferida utilizando el método UPGMA. El árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 2.18566002. El árbol se dibujó a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método Kimura 2-parámetro y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 17 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas eran 1^a + 2^a + 3^a + no codificante. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Hubo un total de 67 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6

3.7.7. Densidad estomática

Se empleó la metodología descrita por Hernandez et.al. (2006). Seleccionando plantas en estado de floración y fructificación, muestreando segmentos de tejido foliar de 25 cm² de la parte media del limbo de cada lado de la quinta hoja, contada desde la hoja bandera hasta la base. Las muestras seleccionadas se preservaron con un fijador químico, FAA (Formol 75%, Etanol 10% y Ácido Acético glacial 15%). A cada muestra se le realizaron cortes epidérmicos, desprendiendo la cutícula tanto abaxial como adaxial, con hojillas de afeitar nuevas y enteras. Cada corte se colocó en el centro del área grabada de la cámara Newbauer, para evitar la deshidratación rápida del tejido epidérmico, se adicionó 5 ul de agua, luego se tapó la muestra con un cubre objeto, para así poder ser observado con un microscopio óptico (aumento del ocular 10X y objetivo de 40X)

En las observaciones solo se contabilizaron los estomas tanto del haz y envés que entraban al azar en cada uno de los 25 cuadros de 0,20 mm², que componían el cuadro central de 1 mm² de la cámara, se tomó como una patrón los cuadros de las cuatro esquinas y el centro del cuadro central de la cámara, para el conteo y posterior aproximación, evitando que la muestra se mueva de las zonas de observación. El número de estomas observados se calcularon por milímetro cuadrado (e/mm²) y los valores tabulados, fueron analizados (ANOVA) bajo paquetes estadísticos InfoStat , para calcular la media, valores máximos y mínimos y correlaciones presentes tanto en el haz como en el envés.

3.7.8. Cuantificación de clorofila

Para la determinación de clorofila se empleó el método de extracción con etanol (Wintermans & Motts, 1965) en discos foliares de 1.3 cm^2 tomados de la zona media de la tercera hoja emitida contando desde la hoja cigarro. La extracción se realizó macerando cada disco foliar en un mortero con 4.0 ml de la solución fría de etanol 98% + MgCO_3 (0.5 g l^{-1}) transfiriendo el extracto a un tubo de ensayo; luego se lavó el mortero con otros 4.0 ml de la solución, así completando un volumen final de 8 ml. Se separó el extracto por centrifugación a 3000 xx g, durante 5 minutos, luego de obtener el extracto se leyeron las absorbancias a 649 y 665 nm en un espectrofotómetro MARCA “UNICO” modelo 1205. A partir de esos datos se calcularon las concentraciones de clorofila a (Cla), clorofila b (Clb) y clorofila total (Clt), según las siguientes formulas:

$$\text{Cla} = [(13.7 \times A_{665}) - (5.76 \times A_{649})] \times V/\text{PD}$$

$$\text{Clb} = [(25.8 \times A_{649}) - (7.6 \times A_{665})] \times V/\text{PD}$$

$$\text{CIT} = [(6.10 \times A_{665}) + (20.04 \times A_{649})] \times V/\text{PD}$$

Donde:

V = volumen final extracto etanólico (8.0 ml); PD = peso seco disco foliar (g)

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.Resultados

4.1.1.Ajuste del protocolo de extracción de ADN

La extracción de ADN de *Musáceas* se realizó recolectando la hoja más joven (hoja cigarro) de plantas en cualquier estado vegetativo de cada una de las, conservadas a -40 °C

Los cambios realizados al protocolo de EMBRAPA (2010) modificado por Romero (2011) se detallan a continuación:

Al control de fenoles se empleó ácido ascróbico a 150 mg/L a la hoja cigarro por 3 min

El peso de tejido vegetal fue de 0,5 g y ubincado en el mortero para su maceración con nitrógeno líquido hasta la pulverización de la muestra

1. La maceración se recolectó 0,3 g en se transfirió a microtubos de 1.5 ml. y se adicionó 700 ul del tampon buffer (2 ml. de CTAB 1%, 2,8 ml. NaCl 1,4M, 1 ml. Tris-HCl 100 mM. pH 8.0; 0,4 ml. EDTA 20 mM., 0,1 g. PVP uL β -mercaptoetanol 0,1% y 3,7 ml. agua destilada).
2. La muestra se incubó en baño María a 65°C por 60 min. cada 15 min. se mezcló por inmersión
3. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. transfiriendo la fase acuosa a un microtubo nuevo.
4. Se adicionó igual volumen del tampón CIA Cloroformo alcohol isoamilico (24:1), mezclando por inmersión durante 5 min.
5. Se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos y se transfirió la fase superior a otro tubo.
6. Se adicionó CIA en igual volumen y se mezcló por inversión durante 5 min.; se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm.
7. Se transfirió a un tubo nuevo para la precipitación de los ácidos nucleicos adicionando 1 volumen de isopropanol helado. Se dejó reposar 3h a 20°C.
8. Se centrifugó por 10 min. a 12000rpm. y se retiró el isopropanol, después se realizaron dos lavados al pellet con 500 uL de etanol 70 %, centrifugando por 5 min.
9. Se descartó el etanol y se secó en baño seco a 37°C por 15 min.

10. Posteriormente se resuspendieron los ADN's en 50 ul de TE 1X pH 8.0.

4.1.2. Extracción de ADN genómico

Para todos los cultivares de *Musáceas* la cantidad de ADN_g obtenido se encontró entre los rangos de 90 ng/ul con calidad idónea para la técnica de marcadores moleculares RAPD's (Figura 1).

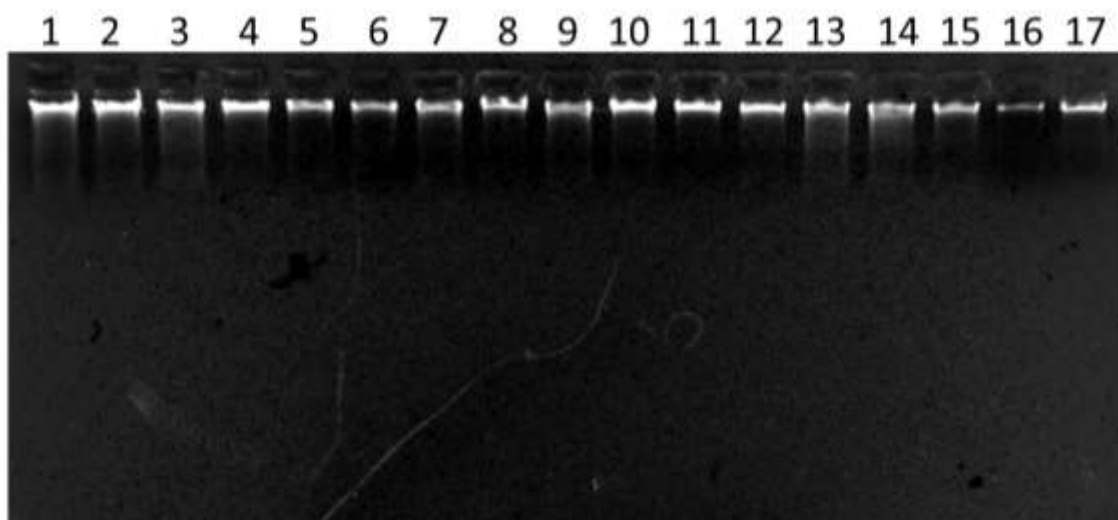


Figura 1 Productos de extracción de ADN: 1 Guineo Jardín (GJ); 2 Filipino (F); 3Williams (W); 4 Orito (O); 5 Gros Michel (GM); 6 Vines (V); 7 Manzano (M); 8 Dominico Gigante (DG); 9 Dominico Verde (DV); 10 Dominico Negro (DN); 11 Dominico Hartón (DA); 12 Barraganete (B); 13 Limeño (L); 14 Maqueño Verde (MV); 15 Maqueño Morado (MO); 16 Curare (C); 17Cuatrofilos (Cu).

4.1.3. Selección de primers y obtención de bandas polimórficas por PCR-RAPD

Las cinco combinaciones de iniciadores presentaron los siguientes números de bandas amplificadas, bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo en 17 cultivares de *Musas* estudiados (cuadro 5).

Cuadro 5. Oligonucleótidos decámeros, bandas amplificadas, bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo entre los 17 cultivares de *Musa* spp.

Combinación de oligonucleótidos	Secuencia	Bandas amplificadas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
M 07	5'-CCGTGACTCA-3'			
A 01	5'-CAGGCCCTTC-3'	15	13	86,6
OPA 04	5'-AATCGGGCTG-3'			
PLAT	5'-GACAGACAGA-3'	14	13	92,8
M 07	5'-CCGTGACTCA-3'			
OPA 10	5'-GTGATCGCAG-3'	14	13	92,8
OPC15	5'-GACGGATCAG-3'			
A 01	5'-CAGGCCCTTC-3'	15	14	93,3
OPA 15	5'-GACGGATCAG-3'			
M 04	5'-GGCGGTTGTC-3'	15	14	93,3
TOTAL		72	67	
Promedio		14,4	13,4	90,9

El patrón típico generado por los marcadores RAPD en este estudio muestran los productos amplificados por la combinación de los oligonucleótidos decámeros (OPC15 y A01) con 14 bandas polimórficas obtenidos entre las 17 accesiones de bananos y plátanos estudiados (Figura 2).

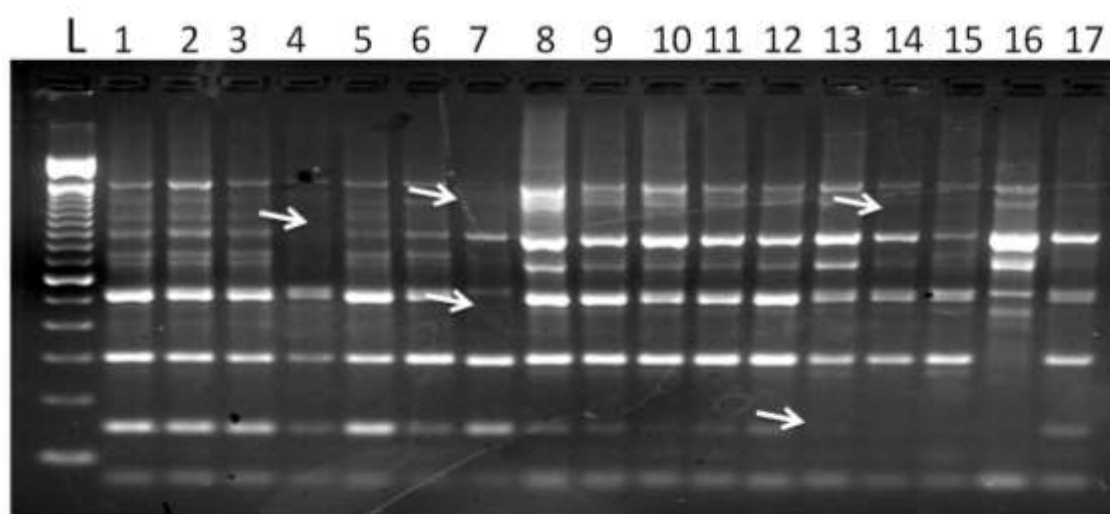


Figura 2. Amplificación de marcadores RAPD producidos por la combinación OPC 15 y A 01: Escalera marcador de peso molecular (L); 1 Guineo Jardín (GJ); 2 Filipino (F); 3Williams

(W); 4 Orito (O); 5 Guineo seda (GM); 6 Vines (V); 7 Manzano (M); 8 Dominico Gigante (DG); 9 Dominico Verde (DV); 10 Dominico Negro (DN); 11 Dominico Hartón (DA); 12 Barraganete (B); 13 Limeño (L); 14 Maqueño Verde (MV); 15 Maqueño Morado (MO); 16 Curare (C); 17 Cuatrofilos (Cu). Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 2,5 %, teñido con bromuro de etidio, las flechas marcan las bandas polimórficas.

La combinación M 07 y OPA 10 generó un patrón típico para los cultivares de plátanos con genoma de *M. balbisiana*, dentro de este grupo, el cultivar Orito presentó el mismo amplicón que presentaron al de estos cultivares (Figura 3).

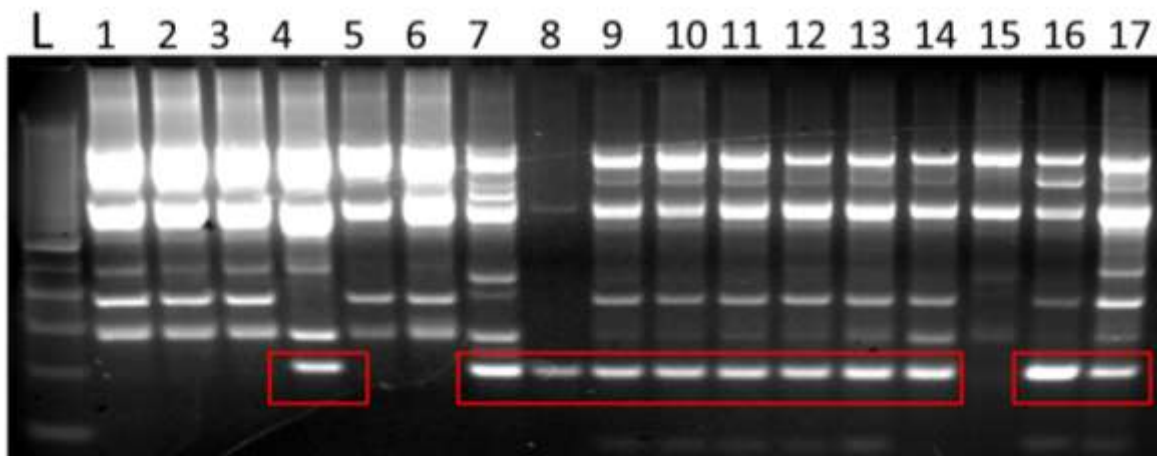


Figura 3. Amplificación de marcadores RAPD producidos por la combinación M 07 y OPA 10: Escalera marcador de peso molecular (L); 1 Guineo Jardín (GJ); 2 Filipino (F); 3 Williams (W); 4 Orito (O); 5 Guineo seda (GM); 6 Vines (V); 7 Manzano (M); 8 Dominico Gigante (DG); 9 Dominico Verde (DV); 10 Dominico Negro (DN); 11 Dominico Hartón (DA); 12 Barraganete (B); 13 Limeño (L); 14 Maqueño Verde (MV); 15 Maqueño Morado (MO); 16 Curare (C); 17 Cuatrofilos (Cu). Patrón para *M. balbisiana* y Orito.

La combinación OPA 15 y M 04 mostraron un amplicón en los 300 pb para todos los cultivares, mas se distinguió una mayor expresión génica en los cultivares de *M. acuminata* (Figura 4).

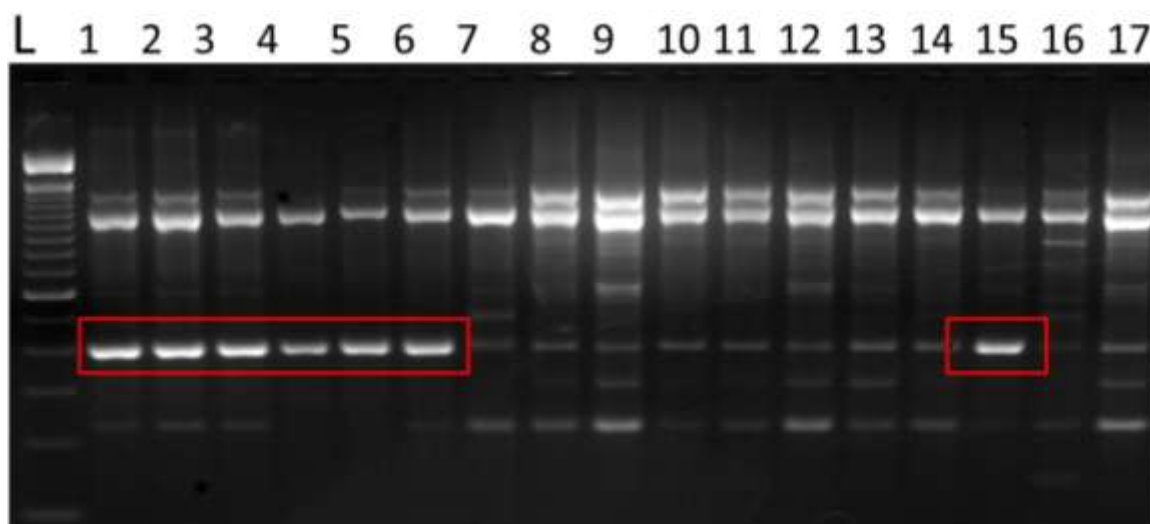


Figura 4. Amplificación de marcadores RAPD producidos por la combinación OPA 15 y M 04: Escalera marcador de peso molecular (L); 1 Guineo Jardín (GJ); 2 Filipino (F); 3Williams (W); 4 Orito (O); 5 Guineo seda (GM); 6 Vines (V); 7 Manzano (M); 8 Dominico Gigante (DG); 9 Dominico Verde (DV); 10 Dominico Negro (DN); 11 Dominico Hartón (DA); 12 Barraganete (B); 13 Limeño (L); 14 Maqueño Verde (MV); 15 Maqueño Morado (MO); 16 Curare (C); 17Cuatrofilos (Cu). Patrón para *M. balbisiana* y Orito.

Cada combinación creó un rango de 14 a 15 bandas amplificadas, para un total de 72 bandas amplificadas con un promedio de 90,9 % de bandas polimórfica.

4.1.4. Agrupamiento de *Musa spp.* para determinar diversidad genética

El análisis de agrupamiento por el método de relaciones evolutivas de taxones produjo un dendrograma con tres grupos (grupo A y grupo B y Grupo C) los que presentan características morfológicas similares entre los cultivares que lo conforman (Figura 5).

En el grupo A se encuentran un subgrupo de Dominico y Barraganete, Limeño, Maqueño verde y Curare este último es un cultivar con genoma AAB de menor altura. A este grupo se agrupó Maqueño morado que a pesar de tener genoma AAA que comparte características del Maqueño verde.

En el grupo B se agruparon los cultivares del subgrupo Cavendish, Gros Michel, y el cultivar Vines siendo tetraploide AAAA, como bananos que se consumen como fruta fresca.

En el grupo C junto al cultivar Orito diploide se agrupó el cultivar Manzano AAB, el Cuatrofilos siendo de Genoma ABB.

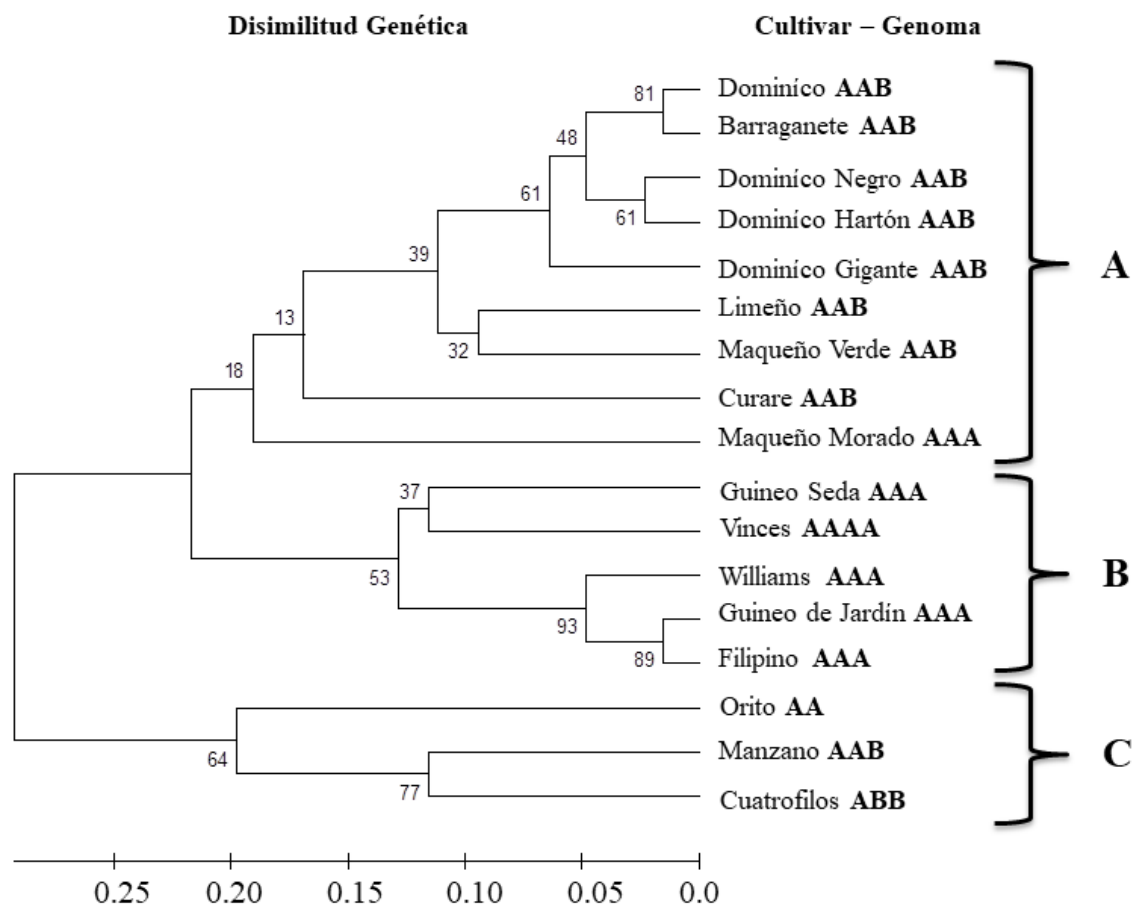


Figura 5. Árbol filogenético generado de los 17 cultivares de *Musa* spp. Dendograma basado en el análisis RAPD's. Las distancias evolutivas se dedujeron empleando el método Kimura 2-parámetro. Grupo A genoma de *M. balbisiana*, grupo B genoma de *M. acuminata* y Grupo C Orito, Manzano y Cuatrofilos.

4.1.5. Densidad estomática

4.1.5.1. Densidad estomática abaxial

- a) **Cultivar *M. acuminata*.** En la cutícula abaxial el Orito y Guineo Seda presentaron diferencia significativa con mayor número de estomas 185 y 174 e/mm², los cultivares Williams y Filipino mantienen una densidad estomática de 155 y

143 e/mm², respectivamente. El número estomas se reduce para Maqueño Morado, Guineo Jardín y Vines con densidades entre 129 y 120 e/mm².

- b) Cultivar *M. balbisiana*.**- En la cutícula abaxial el Barraganete presentó diferencia significativa con mayor número de estomas 233 e/mm². Los cultivares Cuatrofilos, Dominico Harton mantienen una densidad estomática de 199 y 193 e/mm². Los cultivares Dominico Negro, Dominico Verde y Curare, Dominico Gigante y Maqueño Verde presentan una menor densidad estomática entre 182 y 167 e/mm². La densidad estomática se reduce para Limeño y Manzano con 142 y 139e/mm²respectivamente (figura 6 y gráfico 1).

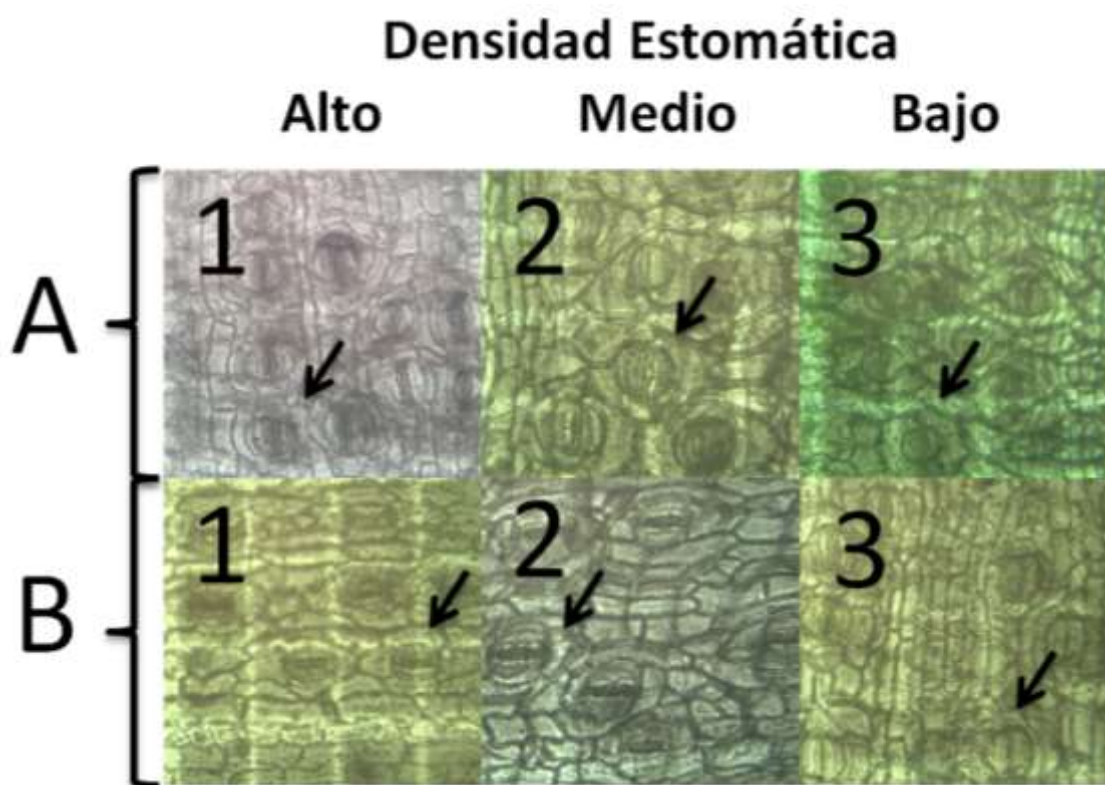


Figura 6. Densidad estomática abaxial. Los cultivares de genoma *M. acumina* se encuentran en el grupo A, y los cultivares de genoma *M. balbisiana* en el grupo B. A1 Se presentan las densidades estomáticas altas (Orito), A2 Se presentan las densidades estomáticas medias (Williams), A3 Se presentan las densidades estomáticas bajas (Maqueño Morado). B1 Se presentan las densidades estomáticas altas (Barraganete), B2 Se presentan las densidades estomáticas medias (Cuatrofilos), B3 Se presentan las densidades estomáticas bajas (Limeño). Los estomas están señalados mediante flechas visualizados con u microscopio óptico (40X)

Densidad estomática abaxial

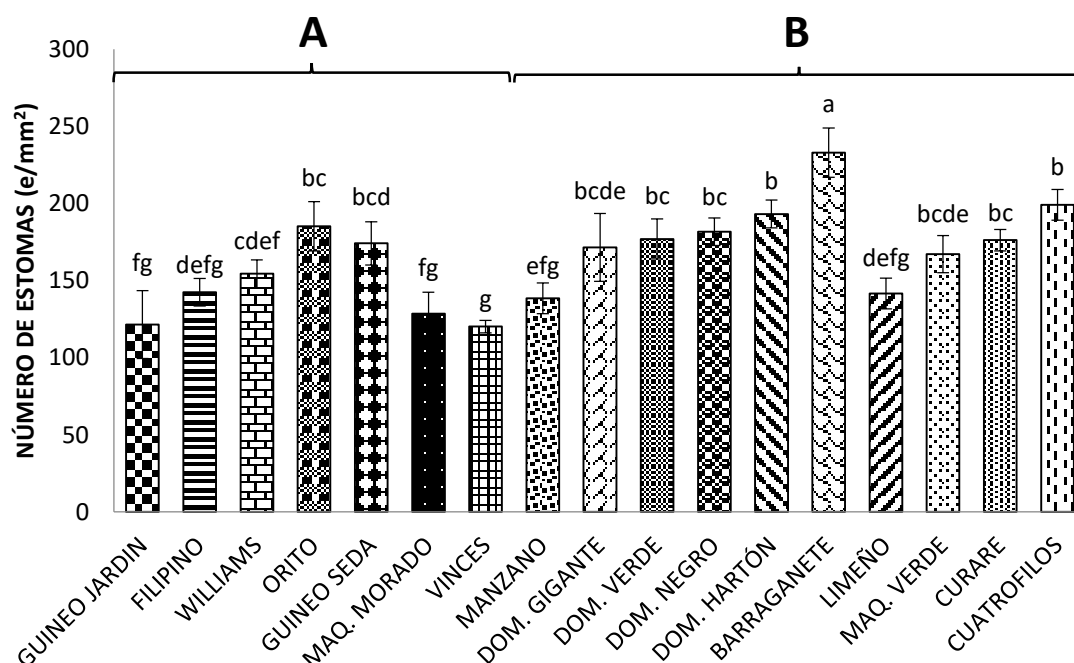


Grafico 1. Los cultivares de genoma *M. acuminata* se encuentran en el grupo A y los cultivares de genoma *M. balbisiana* en el grupo B. Los valores con letra similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($P \leq 0.05$), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ($\pm$).

4.1.5.2. Densidad estomática adaxial

- a) **Cultivar *M. acuminata*.** La cutícula adaxial de los cultivares Williams, Guineo Seda y Orito presentaron mayor número de estomas entre 58 y 50 e/mm². Los cultivares Filipino, Gineo Jardín y Maqueño Morado mantienen una densidad estomática entre 42 y 38 e/mm². El número estomas se reduce para Vines con 23 e/mm².
- b) **Cultivar *M. balbisiana*.** La cutícula adaxial de los cultivares Manzano, Cuatrofilos y Dominico gigante presentaron mayor número de estomas 43 y 34 e/mm², Los cultivares Maqueño Verde y Curare presentaron una menor densidad estomática entre 28 y 21 e/mm². La densidad estomática se reduce para Barraganete, Dominico Hartón, Limeño, Dominico Verde y Dominico Negro con 14 y 9 e/mm² (figura 7 y grafico 2).

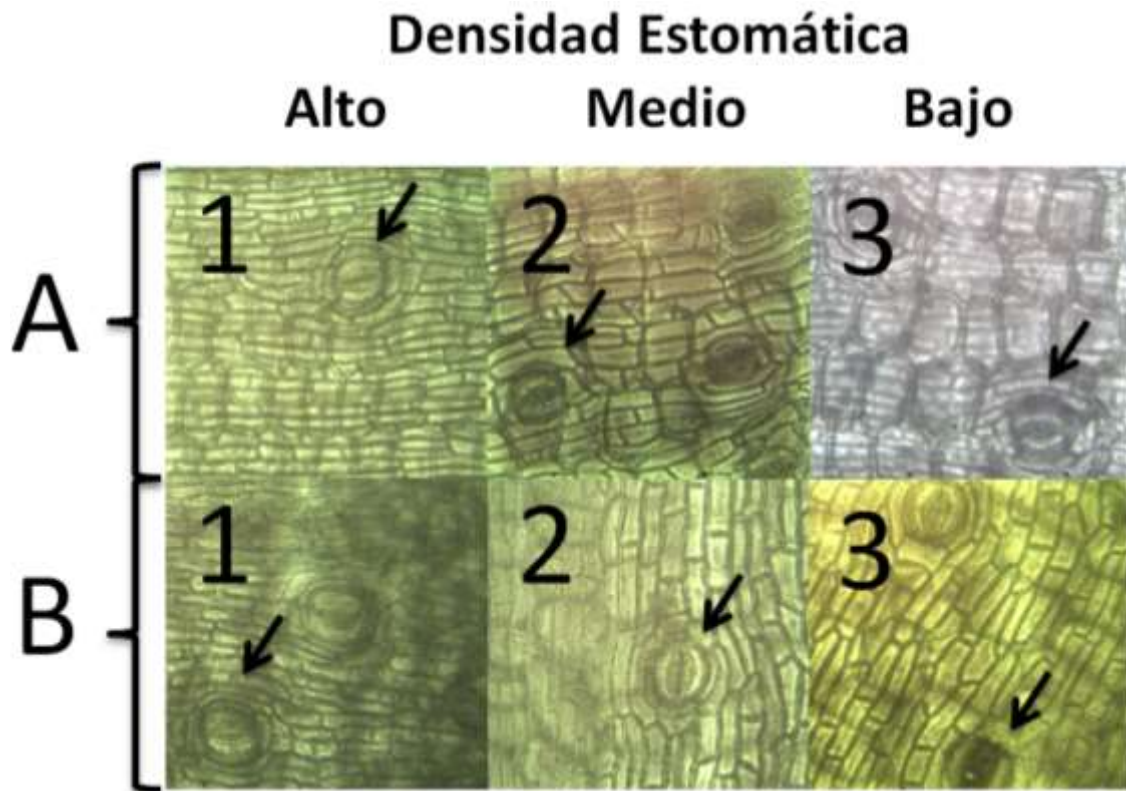


Figura 7. Densidad estomática adaxial. Los cultivares de genoma *M. acuminata* se encuentran en el grupo A, y los cultivares de genoma *M. balbisiana* en el grupo B. A1 Se presentan las densidades estomáticas altas (Williams), A2 Se presentan las densidades estomáticas medias (Filipino), A3 Se presentan las densidades estomáticas bajas (Vinces). B1 Se presentan las densidades estomáticas altas (Manzano), B2 Se presentan las densidades estomáticas medias (Maqueño Verde), B3 Se presentan las densidades estomáticas bajas (Barraganete). Los estomas están señalados mediante flechas visualizados con u microscopio óptico (40X)

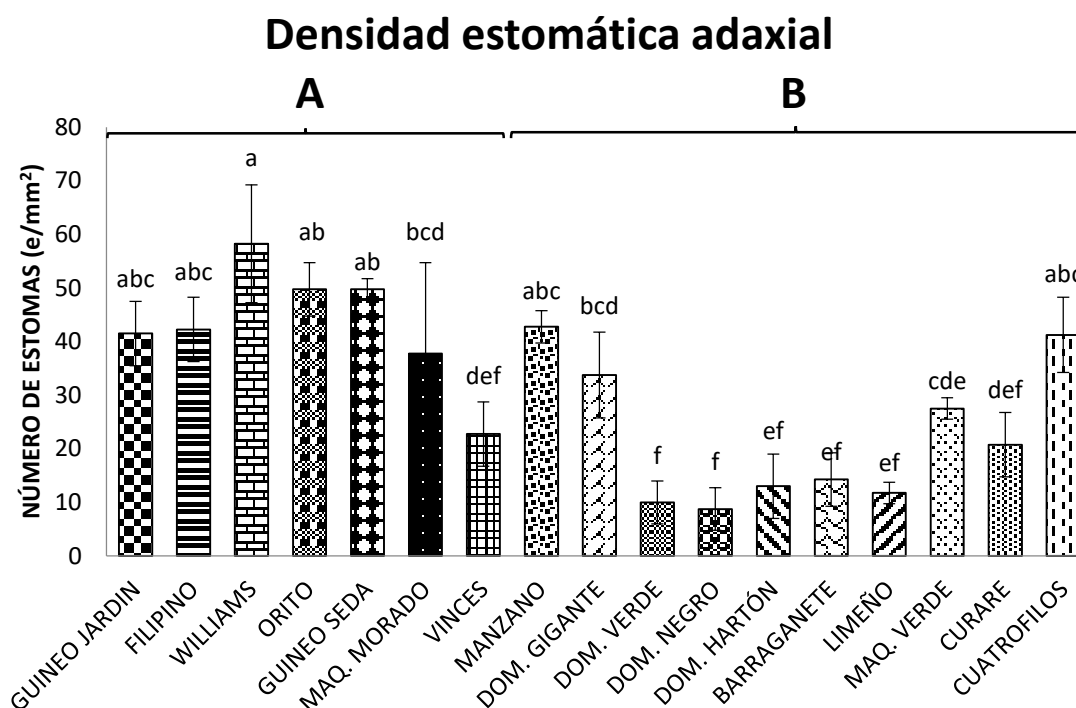


Grafico 2. Densidad estomática adaxial. Los cultivares de genoma *M. acuminata* se encuentran en el grupo A y los cultivares de genoma *M. balbisiana* en el grupo B. Los valores con letra similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($P \leq 0.05$), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ($\pm$).

En su mayoría los bananos presentaron mayor densidad estomática Adaxial pudiendo estar relacionada con la forma de consumo, textura y sabor dulce de sus frutos.

A pesar que la densidad estomática en la cutícula adaxial es menor, el diámetro de los estomas es mayor a los que se encuentran en la cutícula abaxial.

4.1.6. Clorofila Total

- a) **Cultivar *M. acuminata*.**- El contenido de clorofila total entre los cultivares Guineo Seda y Williams presentaron valores de 4,61 y 3,26 mg/g. En los cultivares Maqueño Morado, Filipino, Guineo de Jardín, Orito y Vines la cantidad de clorofila se redujo con 2,88 y 2,26 mg/g respectivamente.

b) Cultivar *M. balbisiana*.- El contenido de clorofila total entre los cultivares Manzano, Cuatrofilos, Curare y Barraganete presentaron valores de 3,34 y 3, 17 mg/g. En los cultivares Dominico Verde, Dominico Hartón, Limeño, Maqueño Verde y Dominico Negro cantidad de clorofila se redujo con 2,85 y 2,07 mg/g (grafico 3).

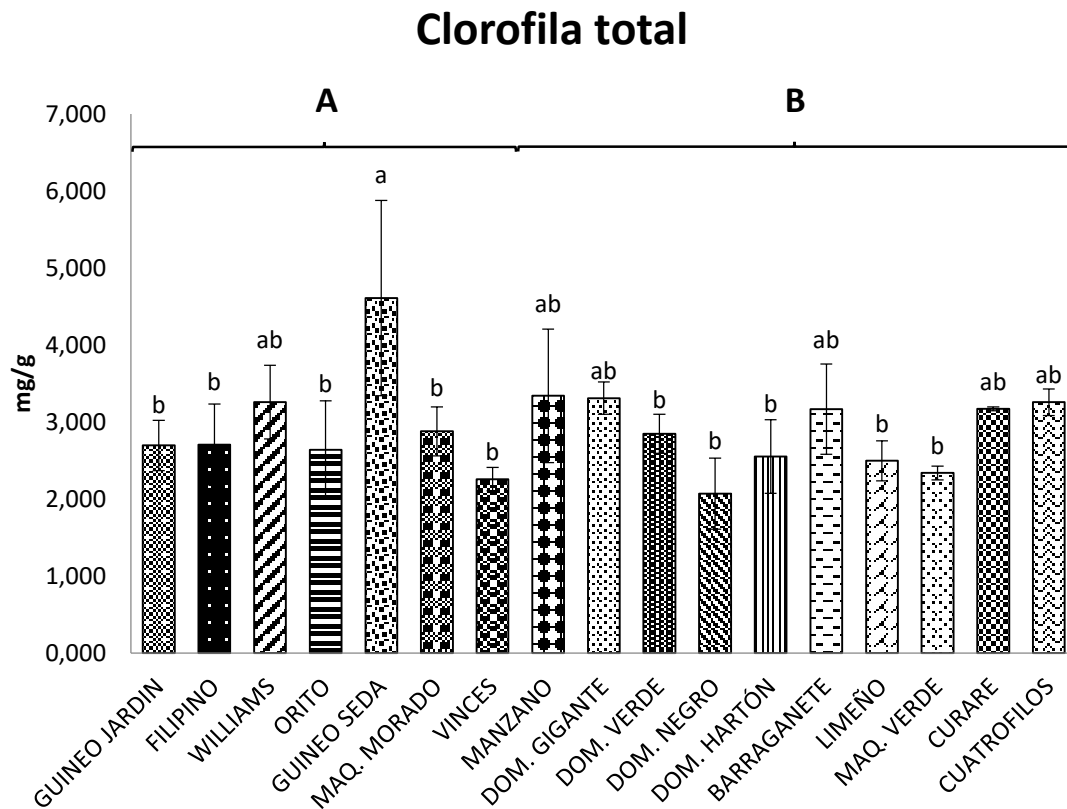


Grafico 3 Cuantificación de clorofila total. Los cultivares de genoma *M. acuminata* se encuentran en el grupo A y los cultivares de genoma *M. balbisiana* en el grupo B. Los valores con letra similares no presentan diferencias estadísticas significativas al nivel de ($P \leq 0.05$), por el procedimiento de comparación múltiple de Tukey. Las barras indican el ES individual para tratamiento ($\pm$).

4.2.Discusión

4.2.1. Material Vegetal

En el protocolo que se ajustó para la extracción de ADN de *Musáceas* se pudo establecer que es necesario recolectar la hoja más joven en estado fisiológico de hoja cigarro, que permite el muestreo en sus distintos estados vegetativos y se almacenan a - 40 °C, Esto difiere de Crouch et al, (1998). ya que ellos realizaron una previa limpieza con Etanol antes de su conservación en - 80 °C.

4.2.2. Extracción de ADN

Previamente se realizaron tratamientos de ácido ascórbico para evitar los problemas de fenolización lo que interrumpía realizar la extracción de ADN genómico de buena calidad sin contenidos como polisacáridos. Este problema se ha observado en mayor proporción en los cultivares de *M. balbisiana* lo que incidió para la realización de un pretratamiento con ácido ascórbico y así evitar problemas en todos los cultivares. Esto coincide con Goodin et al., (2000) quien concluye que las altas concentraciones de polisacáridos, polifenoles y taninos, estos degradan el ADN. Estos factores dificultan la calidad en el momento de la extracción.

Previamente el macerado del tejido vegetal se realizó con nitrógeno líquido, lo que permitió evitar problemas a la producción de enzimas que deterioren el ADN, logrando una mejor lisis mecánica pulverizando el tejido vegetal y facilitando la penetración y la función del tampón bufer y el Mercaptoetanol, corroborando con el protocolo de Doyle & Doyle (1990). Este proceso de pulverización se ajustó al protocolo propuesto por EMBRAPA, (2010) modificado por Romero (2011), obteniendo la calidad y cantidad necesaria para la técnica RAPD's

4.2.3. Análisis de agrupamiento de *Musa spp.* para determinar diversidad genética

El análisis del agrupamiento mostró que en el grupo A se encuentra un subgrupo de Dominico y Barraganete que comparten características morfológicas similares como altura

a diferencia del Dominico gigante que es más alto, forma y tamaño del fruto, hábito foliar, resistencia a Sigatoka Negra. Igual que Maqueño verde y Limeño que comparten características muy distintivas como la longitud y forma de fruto, color del pseudotallo y la pigmentación de las vainas internas. Además el Curare se encuentra en este grupo, es un cultivar con genoma AAB de menor altura, color de pseudotallo rosa rojizo, frutos con longitud de 27 cm. A este grupo se unió el Maqueño morado que a pesar de que su fruto se consume como postre comparte características muy características del Maqueño verde (Guerrero, 2016).

En el grupo B los triploides AAA que se consumen como postre y en estado fresco se diferenciaron los subgrupos Cavendish y Gros Michel. El Tetraploide Vines se unió al cultivar Gros Michel, aunque no tan cercano genéticamente pudiendo ser el mutante de Gros Michel (Robinson & Galán, 2011). Estos cultivares son característicos por su fruto, color del pseudotallo entre verde amarillento y verde medio, frutos que oscilan entre 21 y 25 cm al igual que Vines siendo un tetraploide AAAA, con excepción del Gros Michel con frutos entre 25 y 30 cm, pero de características características de *M. acuminata* (Guerrero, 2016).

El Orito subgrupo “Sucrier” contenido en el grupo C es uno de los ancestros de los triploides AAA actualmente (Robinson & Galán, 2011). En estudio previos Nadal et al, (2009) también demostraron que el cultivar Manzano del Subgrupo “Silk” no se unió a los grupos A y B, lo que podría ser que pese a tener genoma de balbisiana sus frutos se consumen como postre.

El Orito y Manzano AAB comparten frutos de igual diámetro entre 16 y 20 cm. El Cuatrofilos ABB se unió a estos cultivares pudiendo ser una de las razones la capacidad de resistencia a plagas y enfermedades (Guerrero, 2016).

4.2.4. Densidad estomática y relación con la resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra)

Los cultivares estudiados presentan densidades estomáticas entre 54 y 7 e/mm² en el haz y entre 253 y 118 e/mm² en el envés lo que coincide con los resultados obtenidos por Hernández et al., (2006), valores que se encuentran entre 218 y 97 en el envés y entre 33 y 20 en el haz en los cultivares Hartón FHIA 21, FHIA 20, África y Topocho Cachaco

En el banco de germoplasma se encuentran cultivares con alta densidad estomática y con tolerancia a Sigatoka negra lo cual no tiene relación con Vásquez et al., (1990) y Hermoso & Lindorf, (1997) quienes en sus estudios realizados aseguran que la densidad estomática y tamaño del estoma son características asociadas a las respuestas de las plantas con los agentes patógenos. Los estomas escasos podrían ser una barrera contra la penetración de agentes infecciosos asociados con resistencia o susceptibilidad al ataque de *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka Negra) Además afirman que la densidad estomática es uno de los mecanismos de resistencia estructural que impiden la penetración del patógeno a la planta.

Beveraggi et al, (1995) en sus estudios realizados sobre características morfológicas y fisiológicas de estomas en hojas, demostraron que la resistencia a Sigatoka negra, es gracias a mecanismos no estomáticos. El número de estomas podría indicar la eficiencia de las especies vegetales en el proceso de respiración y fotosíntesis, y otras funciones como la producción de sustancias químicas que impedirían el avance del patógeno en la hoja.

Sánchez et al, (2010) detectaron que la presencia de lignina, peróxido de hidrógeno y fenoles en hojas de Grande naine y Calcuta 4 al acumularse estos compuestos están relacionados con la respuesta de la planta ante el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra). Los genes de quitinasa y análogos se presentan en algunas variedades de *Musa spp.* que pueden ser resistentes, tolerantes o susceptibles a Sigatoka negra en banano. El gen de quitinasa se expresa en la variedad Calcuta 4 de forma basal y cuando se inocula con *Mycosphaerella fijiensis* (Saavedra, 2012)

4.2.5. Clorofila

La densidad de siembra en el banco de germoplasma de los cultivares estudiados es muy baja de 5 metros entre calles y 4 metros entre plantas, debido a que la parcela de musaceas tiene fines de conservación y no de producción. Por lo tanto los valores no coinciden con los datos reportados por Cayón (2001). Esto es debido a que el contenido de clorofila aumenta con incrementos en la densidad de siembra, como respuesta de la planta para compensar la falta de luz y maximizar la captación de energía como lo reportan (Barrera, Cardona, & Cayón (2011)

Adicionalmente al realizar un análisis nematológico se determinó que existía una población de 16000 nematodos por gramo de raíces, superando el umbral económico. En estudios realizados por Restrepo et al., (2008) pudieron observar que los síntomas provocados por *Radopholus similis* en las plantas afectadas es la disminución del tamaño, número de hojas y desarrollo de las plantas, además reducción del peso del racimo entre otro y *Meloidogyne spp* amarillamiento de las partes aéreas de la planta, hojas más angostas y detención del crecimiento de la planta y menor producción, razones por las cuales los niveles de clorofila disminuyen y a su vez la capacidad fotosintética de los cultivares.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se logró extraer ADN de diecisiete cultivares de *Musa spp.* con la calidad necesaria para realizar RAPD.
- La técnica RAPD para la caracterización molecular es una herramienta útil y eficiente para mostrar la diversidad genética entre los cultivares de *M. acuminata* y *M. balbisiana*.
- Se pudo identificar tres grupos genéticamente similares entre los diecisiete cultivares de *Musa spp.*
- Los oligonucleótidos usados presentaron 90,9% de polimorfismo, a pesar de que los cultivares son morfológicamente similares.
- El cultivar Guineo Seda, presentó alta densidad estomática adaxial y altos niveles de clorofila.

5.2.RECOMENDACIONES

- Emplear marcadores moleculares que sean más informativos como los AFLP, SSR o ITS para así obtener resultados de mayor confianza.
- Hacer un estudio de anatomía foliar, forma y tamaño de estomas, densidad e índice estomático.
- utilizar un medidor de cuantificación clorofila modernos, para mayor exactitud.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- Aguilar, J. (2006). Programa de banano y plátano. Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), p 9-15
- Arus, P., & Moreno, J. (1993). Principles and Prospects. Plan Breeding. Principles and Prospects, pp. 314–331. Chapman and Hall, London.
- Barrera, J., Cardona, C., & Cayón, D. (2011). El cultivo de plátano (*Musa* AAB Simmonds): ecofisiología y manejo cultural sostenible. Editorial Zenú. 65, 76-80
- Belalcázar, S., & Merchán, V. (1991). Control de enfermedades. el cultivo de banano en el tropico. Colombia. p 55-63
- Beveraggi, A., Zapater, M., & Mourichon, X. (1995). Análisis de la resistencia de los bananos a la *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*). CIRAD-CA, 50-55.
- Bornacelly, H. (2009). Estudio del ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* en tres clones de banano (*Musa* AAA) en tres regiones de la zona bananera del Magdalena. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Brown, T. (2008). Genomas. Editorial Panamericana. p 255
- Brun, W. (1961). Photosynthesis y transpiration of banana leaves as affected by severing the vascular system. *Plant Physiol*, 36: pp. 577 – 580.
- Canale, A., Gomes, U., Padilla, E., & Salado, J. (2004). Valoración de las propiedades cicatrizantes de la cáscara de plátano (*Musa paradisiaca*). Recuperado el 2016 de diciembre de 2016, de http://musalit.inibap.org/pdf/IN050320_es.pdf.
- Canchignia, H., Hernández, S., González, M., & Motte, E. (2006). Genetic Relationships among *Schizolobium parahybum* (Vell.)Blake (Leguminosae) Ecotypes from Ecuador and other Countries.
- Caranza, M. S. (2007). Análisis de la diversidad genética por AP-PCR de accesiones de la colección de *Theobroma cacao* existente en la finca “La buseta”. Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- Cayón, G. (2001). Evolución de la fotosíntesis, transpiración y clorofila durante el desarrollo de la hoja de plátano (*Musa* AAB Simmonds). Infomusa , 12-15.
- Cedeño, G. (2010). Evaluación del comportamiento de doce cultivares de *Musa* spp, inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*. Agente causal de la Sigatoka negra., Portoviejo:.. Manabí .
- Crouch, H., Crouch, J., Jarret, R., Cregan, P., & Ortiz, R. (1998). Segregation at microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. *Crop Sci.*, 38:211-217.

- Daly, J. (1976). Carbon balance of disease plants: Changes in respiration, photosynthesis and translocation. Berlin: Springer.
- De las Rivas, J. (2013). La luz y el aparato fotosintético. En J. Azcon-Bieto, & M. Talón, Fundamentos de la fisiología vegetal (pág. 171). Madrid.
- Del Valle, R. (2006). Mejoramiento Convencional y Biotecnológico. Contribución a la seguridad alimentaria en el trópico. IX Congreso Venezolano de fruticultura. Barquisimeto. p. 91-99
- Devouard, A. (2001). “Taxonomía de los bananos”. Francia. INIBAP – Francia. 105. p. 10
- Doyle, J., & Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh. Focus 12:13-15.
- EMBRAPA. (2010). Extração de DNA de Plantas. – MINIPREP. EMBRAPA. Soja. Londrina, Brazil. 1p
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia. p 79-83
- González, D. (1995). Protocolos para Marcadores Moleculares. Cali, Colombia: CIAT No. 258.
- Gooding, P., Brid, C., & Robinson, S. (2000). Actividad de la polifenol oxidasa y expresión génica en la fruta de los bananos Goldfinger (AAAB, FHIA-01). INFOMUSA, 6.
- Guerrero, P. (2016). Características morfológicas de cultivares de musáceas establecidos en la finca experimental “La María.”. Quevedo. p 19-25
- Hermoso, L., & Lindorf, H. (1997). Anatomía foliar del Variante Somaclonal (CIEN BTA03) Musa sp, resistente a la Sigatoka Amarilla. Anales de Botánica Agrícola., 4:63-67.
- Hernández, Y., Portillo, F., Portillo, M., & Navarro, C. (2006). Densidad estomática en materiales de plátano. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 23: 292-297.
- INIBAP. (2001). Musalogue: a catalogue of Musa germplasm. Diversity in the genus Musa.
- Kaemmer, D., Afza, R., Weising, K., Kahl, G., & Novak, F. (1992). Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana. Biotechnology, 1030 - 1035.
- Lepoivre, P. B. (2003). Banana- *Mycosphaella fijiensis* interactions. Costa Rica: INIBAP.
- López, J. (2015). Respuesta de diez cultivares de *Musa* spp., al ataque del nemátodo barrenador *Radopholus similis* y el nematodo nodulador de la raíz *Meloidogyne* spp.. En: XIII Seminario Nacional de Sanidad Vegetal. Quevedo.

- Mc Clelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Núcleo Nucl. Acids Res.*, 18:7213-7218.
- Morales Becerril, I. (2008). Recuperado el 24 de Octubre de 2015, de Electroforesis: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Exposicion_electroforesis_5087.pdf
- Moreira, C. (2015). Efecto de la diversidad intraespecífica en el cultivo de Musáceas como medida de control de sus problemas fitosanitarios. Quevedo .
- Orozco, M., Rodríguez, C., & James, A. (2005). La biología de *Mycosphaerella fijiensis* y su interaccion con *Musa* spp. Black sigatoka in México, 10, 33-37.
- Paéz. (2012). Caracterización Morfo-agronómica de doce cultivares de Musáceas y evaluación a la resistencia de la enfermedad de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella Fijiensis*). La Maná - Cotopaxi.
- Ploetz, R., & Mourichon, X. (1999). First report of black Sigatoka in Florida. (Disease Note) *Plant Disease* 83:300.
- Powell, W. (1992). Plant genomes, gene markers, and linkage maps. In Moss, J.P, ed. *Biotechnology and crop improvd in Asisa*. p 297-306
- PROECUADOR. (2016). Recuperado el 15 de Enero de 2017, de <http://www.proecuador.gob.ec/compradores/oferta-exportable/banano/>
- Restrepo, Y., Patiño, L., & Castañeda, D. (2008). Efecto de los nematodos en la cantidad y calidad de raíces y métodos de evaluación. *POLITÉCNICA*, 47-57.
- Robinson, J., & Galan, V. (2011). *Platanos Bananas*. Editorial Mundi-Prensa, p 1-8, 28- 46
- Romero. (2009). Analisis del Polimorfismo, mediante el Uso de Marcadores SSRs, de variedades de *Musa* spp., Resistente, Tolerantes o Suceptibles a la Infección de *Mycosphaerella fijensis*. Guayaquil.
- Romero. (2011). Caracterización molecular de clones de plátano (*Musa* AAB) CVS. Dominico y Barraganete utilizando marcadores moleculares RAPD'S". Guayaquil.
- Saavedra, C. (2012). Identificación de Genes Candidatos de Resistencia a Sigatoka negra en Variedades de Banano y Plátano". *GUAYAQUIL*. p 68
- Salisbury, F., & Ross, C. (1994). *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamericana. , 682p.
- Sánchez, C., Alvarado, Y., Cruz, M., Acosta, M., Leiva, M., & Roque, B. (2010). Detección de compuestos bioquímicos relacionados con la respuesta defensiva en plantas de *Musa* spp. inoculadas artificialmente con *Mycosphaerella fijiensis*. *Biotecnología Vegetal*, 2: 89 - 97 .
- Sánchez, M., & Aguirreolea, J. (2013). Transpiración y control estomático. En J. Azcon, & N. Talón, *Fundamentos de la fisiologia vegetal* , p 171

- Simmonds, N., & Shepherd, K. (1955). Taxonomy and origins of cultivated. Londres. 107-110.
- Simmonds. (1966). Los plátanos. Barcelona: Ed Blume. p 65-66
- Tazan, L. (2003). El cultivo de plátanos en el Ecuador. En: Características vegetativas y de producción de algunos cultivares e híbridos de plátano. Ecuador: raíces, p. 72.
- Vásquez, A., Tapia, A., & Galindo, J. (1990). Ultrastructural studies of the infection process of *Mycosphaerella fijiensis* on *Musa* cultivars. Euphytica, 88:25-34.
- Velasco Mosquera, R. (2005). Recuperado el 19 de Diciembre de 2015, de <http://revistabiotechnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotechnologia/article/viewFile/19/12>.
- Véliz, M. (2011). Reacción de diez cultivares de *Musa* spp. Al ataque de picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) durante el primer año de establecimiento. Santo Domingo. p 95.
- Waugh, R., & Powell. (1992). Using RAPD markers for crop improvement. Trends Bio/technol 10: 186–191.
- Williams, G. A. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 18:6531-6535.
- Wintermans, J., & Mots, D. (1965). Spectrophometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. p 8
- Zaffary, G., & Kerbauy, G. (2006). Detecção de variação somaclonal em microplants de *Musa acuminata* cv. Grande Naine. p 253-255.

Financiamiento

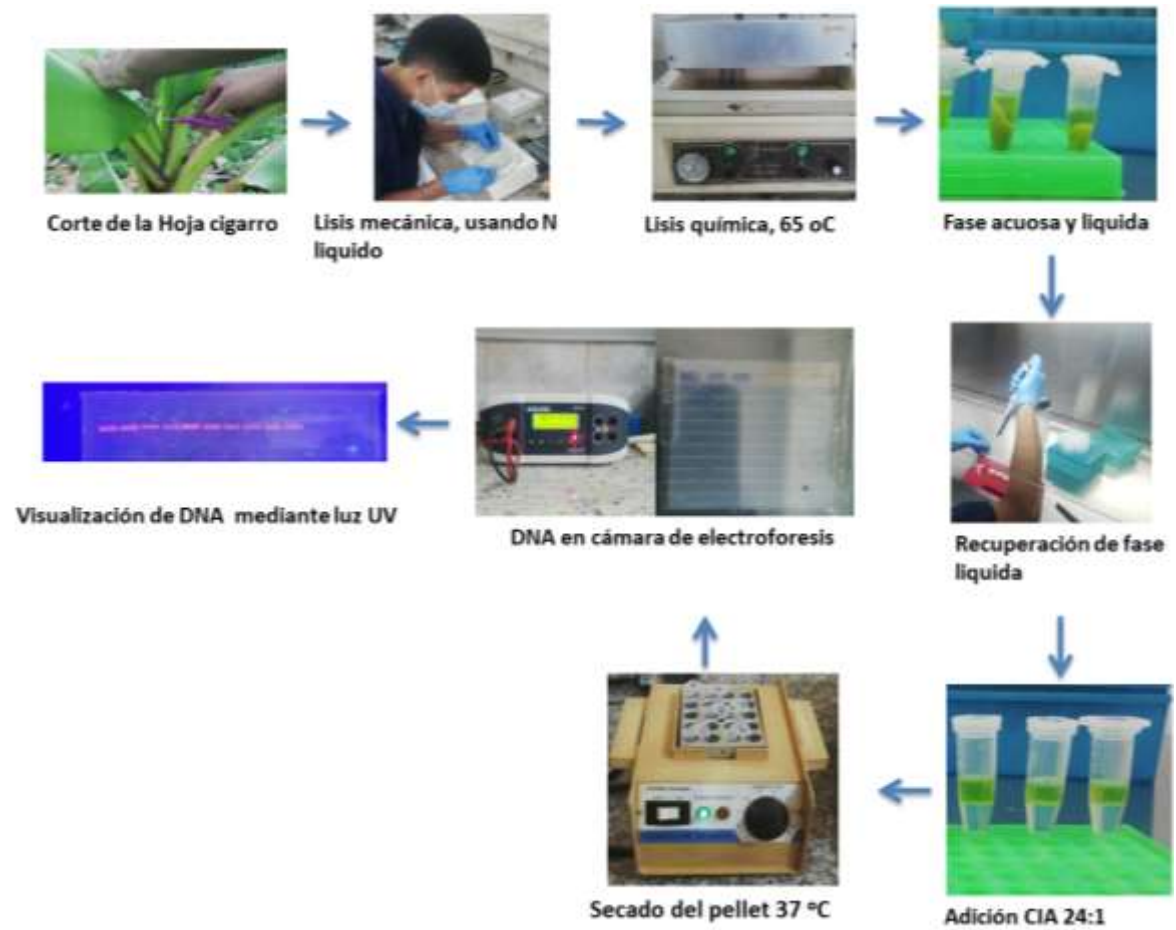
El financiamiento al desarrollo del proyecto de investigación de tesis “Diversidad genética de plantaciones de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* establecidas en el Ecuador utilizando RAPD’s” se ejecutó por Fondo Competitivo de Investigación Científica y tecnológica “FOCICYT Convocatoria 4”. Título: Actividad nematocida a *Radopholus similis* por rizobacterias nativas y comerciales del género *Pseudomonas* spp. En el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

7.1. Anexos

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN



Anexo 2. Preparación de la PCR-RAPD



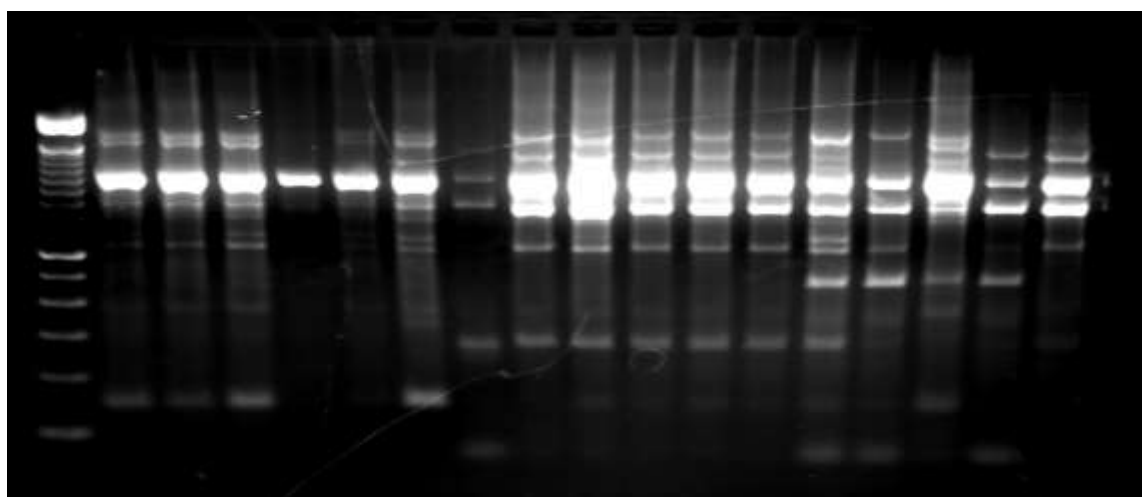
Preparación del Mix PCR-RAPD

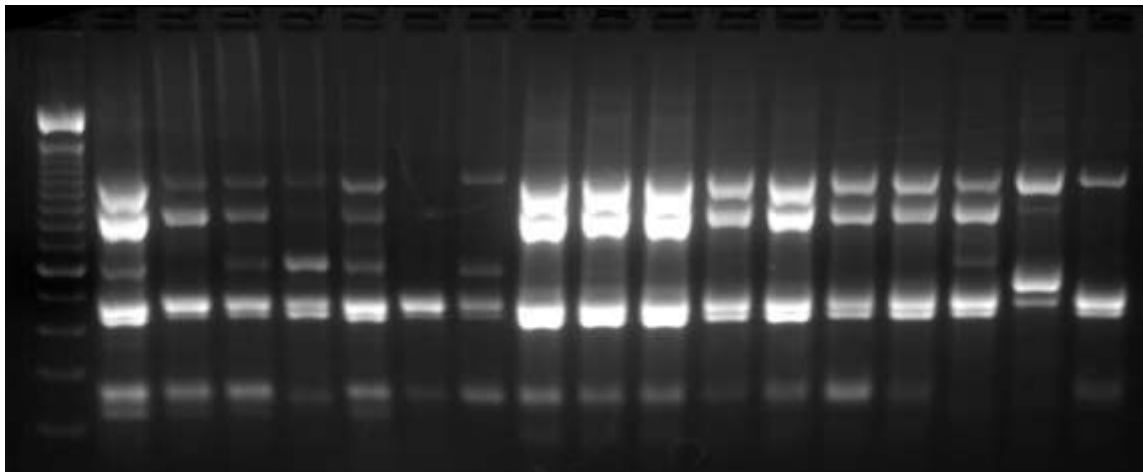


Termociclador

Anexo 3. Productos de amplificación RAPD

Combinación M 07 – A 01





Anexo 4. Metodología para cuantificación de estomas



Recolección de la muestra



Corte de cutícula de la hoja



Conteo de los estomas

Anexo 5. Metodología para cuantificación de clorofila



Disco foliar de 1,3cm²



Adición de Etanol frio 98% MgC3



Lectura de la Absorbancia de clorofila



Maceración del disco foliar