ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

"CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES MAT 1-1 Y MAT 1-2 DEL HONGO *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA, EN LA PROVINCIA DEL GUAYAS."

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

Julio Andrés Bonilla Jaime

GUAYAQUIL – ECUADOR

2009

AGRADECIMIENTO

A mi familia especialmente a mis padres y hermanos por todo el apoyo recibido durante mis estudios. A Valeria por su ánimo, cariño y ayuda incondicional. A mis amigos de los cuales recibí siempre el apoyo y aliento. De manera especial al M.Sc. Pablo Chong, M.Sc. Omar Ruiz, Ing. Lizbeth Espinoza y a la Dra. María Isabel Jiménez por su invaluable colaboración.

DEDICATORIA

A DIOS

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MI FAMILIA

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ing. Enrique Sánchez
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Dra. Esther Lilia Peralta García
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Washington Cárdenas M.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

Julio Andrés Bonilla Jaime

RESUMEN

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet es el causante de la enfermedad foliar llamada Sigatoka Negra y ataca a las plantas de banano. La Sigatoka Negra es la enfermedad más importante en las plantaciones de banano.

La reproducción sexual de *Mycosphaerella fijiensis* se da por compatibilidad genética o tipo de “sexo o mating types” (tipos de acoplamiento). Esto quiere decir que sólo las líneas de “mating” genéticamente opuestas, son capaces de cruzarse y producir ascosporas. En los hongos ascomicetos heterotálicos la compatibilidad sexual entre individuos haploides depende de los genes que se encuentran en el locus *MAT* que existe como dos alelos alternos Mat1–1 y Mat1–2.

Este trabajo estudió los genes que actúan para que el apareamiento de *M. fijiensis* sea posible. Los aislados de *M. fijiensis* fueron pertenecientes a tres zonas de la provincia del Guayas (Taura, Balao y Mariscal Sucre) y se utilizaron primers específicos para amplificar las regiones de los alelos relacionados con la

interacción sexual de las cepas de *M. fijiensis*. Los aislados de hongos fueron proporcionados por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

Esta tesis utilizó estos mismos aislados de hongos monospóricos con el objetivo de identificar a nivel molecular, en la provincia del Guayas, los tipos de alelos sexuales que se presentan en el hongo que causa la Sigatoka Negra *Mycosphaerella fijiensis*. Se determinó la frecuencia y la proporción que guardan estos alelos entre ellos siendo esta de 2:1 entre Mat 1-1 y Mat 1-2 respectivamente. El análisis de estos resultados determinó que ni las condiciones de las zonas geográficas, ni la forma de manejar los cultivos en las que se encuentran las muestras afectan esta frecuencia. Estudiar y entender la reproducción sexual de *M. fijiensis* tiene una enorme importancia para poder contribuir en futuros estudios de prevención y tratamiento de la grave y cuantiosa enfermedad que provoca.

INDICE GENERAL

RESUMEN VI
INDICE GENERAL.. VIII
ÍNDICE DE FIGURAS X
INDICE DE TABLAS XII
INTRODUCCIÓN 14

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES 6
1.1. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* 6
1.1.1. Taxonomía 8
1.1.2. Ciclo de Vida 9
1.1.2.1. Reproducción 9
1.2. Mecanismos de infección y dispersión 14
1.3. Genes de apareamiento 18

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS 23
2.1. Materiales 23

2.2. Métodos 26

2.2.1. Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* 26

2.2.2. Protocolo de extracción de ADN 27

2.2.3. PCR Multiplex 29

2.2.4. Análisis de datos 34

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSION 37

3.1. Resultados y discusión.. 37

CONCLUSIONES 47

RECOMENDACIONES 49

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución mundial de *M. fijiensis* 2

Figura 2: Gráfico de producción en TM de banano en Ecuador.......................... 4

Figura 3: Distribución mundial de *M. fijiensis* y *M. musicola* en el mundo. 7

Figura 4: Ciclo sexual y asexual de *M. fijiensis*.. 12

Figura 5: Hoja candela o cigarro de una planta de banano 17

Figura 6: Cajas HMG y alfa en *M. fijiensis*.. 21

Figura 7: Ubicaciones geográficas de las localidades muestreadas................. 24

Figura 8: Amplicones esperados del locus MAT de *M. fijiensis* 30

Figura 9: Figura del Tratamiento VS el Tipo de alelo detectado 39

Figura 10: Gráfico de la zona VS el Tipo de alelo estudiado 40

Figura 11: Gráfico del análisis de correspondencia 42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: PCR Mix 32

Tabla 2: Programa de PCR 33

Tabla 3: Resultados de Muestras analizadas 38

Tabla 4: Tabla del valor de X^2 para el tratamiento y el tipo de alelo 39

Tabla 5: Tabla del valor de X^2 para la zona y el tipo de alelo 41

Tabla 6: Tabla de la frecuencia alélica 43

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Foto de los resultados de las experimentaciones……………………56

Anexo 2: Descripción de los estadíos del crecimiento de *M. fijiensis*……..…59

Anexo 3: Estadíos del crecimiento de *M. fijiensis*……………………………….61

Anexo 4: Preparacion de los medios de cultivo…………………………………62

INTRODUCCIÓN

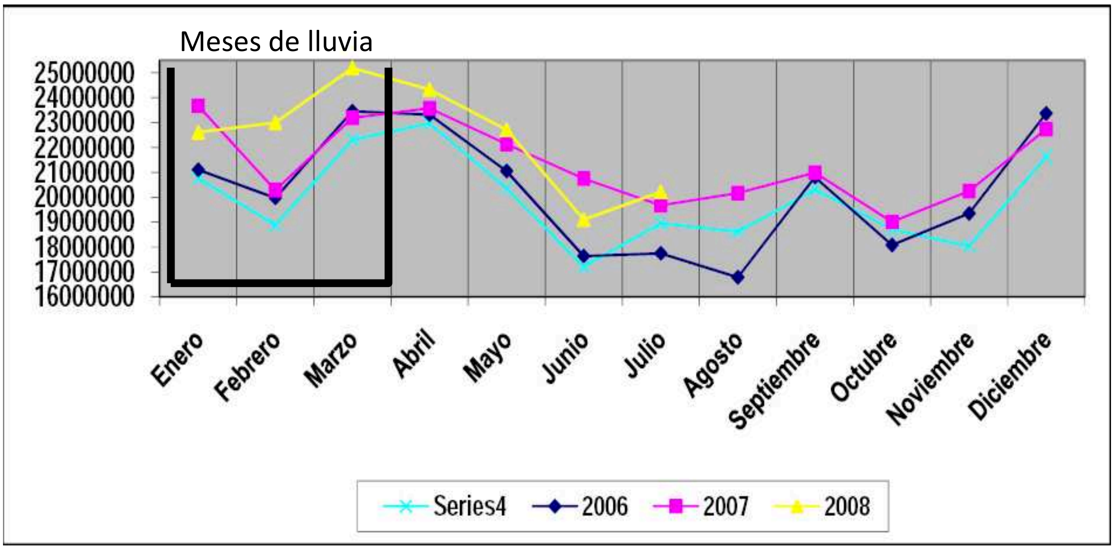
El banano, junto con el arroz, trigo y maíz, se encuentra entre los cultivos de mayor importancia para la seguridad alimentaria a nivel mundial. En el Ecuador, existen alrededor de 180.000 hectáreas dedicadas al cultivo de banano y plátano, productos que son en su mayoría exportados (1). En el 2007 la exportación de banano contribuyó con el 55% de los ingresos totales de las exportaciones tradicionales (1). Sin embargo, estos cultivos se han visto directamente afectados por la enfermedad denominada Sigatoka Negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. La Sigatoka Negra surgió en el Continente Americano en 1972 en el Valle de Sula (Honduras) y en el Ecuador se la detectó por primera vez en 1987 en las haciendas Tímbre, Flamingo y Victoria, localizadas al este de la provincia de Esmeraldas, cercanas a la frontera con Colombia (1,2). En la actualidad se ha extendido a todas las áreas bananeras del Ecuador continental, y ya se ha reportado su presencia en pequeñas áreas cultivadas en la provincia insular de Galápagos (2). A nivel mundial, la Sigatoka Negra se la puede encontrar en todas las zonas donde se realiza cultivos de banano (Fig. 1), y es la enfermedad foliar de banano y plátano más seria en el mundo. La Sigatoka Negra ocasiona severos daños al follaje de la planta destruyendo su capacidad de fotosíntesis y respiración, reduciendo así el rendimiento y calidad de la fruta. El embate de esta enfermedad ha provocando pérdidas de más de 50% en la producción de las plantaciones (1,2).

Figura 1: Distribución mundial de *M. fijiensis*

Elaborado por: La Sociedad Americana de Fitopatología (3).

En los meses más húmedos, como los son los meses entre diciembre y abril, se registran niveles de pérdidas de producción de banano en los años 2006 y 2007 asociados a una alta intensidad de lluvias que crea las condiciones climatológicas óptimas para el crecimiento del patógeno (1,2,4) y a un pobre control de la enfermedad. En el 2008 se observa un aumento de la producción en comparación con años anteriores por el mejoramiento de los controles como son los ciclos de fumigación y la laminación del área afectada (Fig. 2). En los meses subsecuentes de abril hasta noviembre la producción de banano tanto como la infección de *M. fijiensis* baja porque las lluvias cesan y la temperatura aumenta siendo una época seca (1,2).

Figura 2: Gráfico de producción en TM de banano en Ecuador y los meses de lluvia.



Modificado por: Julio Bonilla
Fuente: Asociación de exportadores de banano del Ecuador (A.E.B.E.)

El hongo ascomiceto, *Mycosphaerella fijiensis*, es un organismo haploide, filamentoso, hemibiotrófico y se puede reproducir tanto de forma sexual como asexual (1). La reproducción sexual de *M. fijiensis* se da por compatibilidad genética o tipo de “sexo o mating types” (5,6,7). Esto quiere decir que solo las líneas de “mating” genéticamente opuestas, son capaces de cruzarse y producir ascosporas. En los hongos ascomicetos heterotálicos la compatibilidad sexual entre individuos haploides depende de los genes que se encuentran en el locus MAT (5,7). Este locus existe en dos alelos alternos Mat1 – 1 y Mat1 – 2 y se los llama ideomorfos. Los individuos que participan en el cruce deben tener el alelo contrario para poder reproducirse. Estos alelos no están relacionados el uno con el otro ancestralmente (5,7,8). La recombinación heterotálica crea un alto potencial para que ocurran cambios genéticos dentro de las poblaciones de *M. fijiensis,* debido a que se produce un intercambio de genes durante la meiosis. Este proceso puede conducir a una rápida adaptación a condiciones ambientales, o a la dispersión de alelos que determinen resistencia a fungicidas (6).

La presente tesis tiene como objetivo analizar los genes de apareamiento Mat 1-1 y Mat 1-2 en *M. fijiensis*, y así poder establecer colonias compatibles y fértiles. Esto también permitirá la identificación a nivel genético de los tipos de cruces que se presentan en el hongo *M. fijiensis.* La secuencia nucleótida de los genes Mat1-1 y Mat1-2 servirá de base para el análisis filogenético del hongo, estableciendo la influencia genética de la variación de las diferentes poblaciones por su reproducción sexual (7).

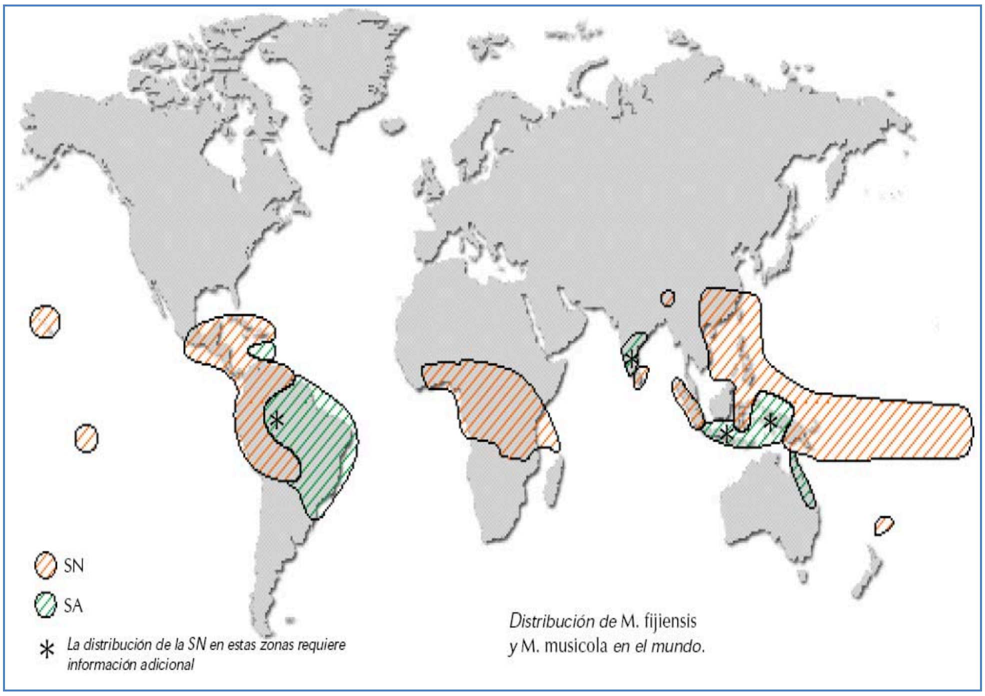
CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Biología de *Mycosphaerella fijiensis*

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* es el agente causal de la enfermedad conocida como Sigatoka Negra en banano y plátano. Es un organismo heterotálico con ciclos de reproducción sexual y asexual. El término heterotálico se refiere a una especie constituida por individuos autoestériles (autoincompatibles), que para la reproducción sexual requieren la unión de gametos compatibles, sin considerar la presencia de ambos órganos reproductores, masculinos y femeninos, en el mismo individuo. Pero, puede también referirse a una especie en la cual los sexos se presentan en talos separados, de modo que para efectuar la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes (1,4,9). El hongo infecta principalmente a plantas de banano y plátano (1,2,4). Otros hongos emparentados a *M. fijiensis*, como *M. musicola,* conocida por causar la enfermedad llamada Sigatoka Amarilla, también es un patógeno importante para la producción bananera, y al igual que su pariente *M. fijiensis* se encuentra ampliamente distribuida en el mundo (fig. 3).

Figura 3: Distribución mundial de *M. fijiensis* y *M. musicola* en el mundo.



SN=Sigatoka Negra, SA=Sigatoka Amarilla.
Elaborado por: Mourichon y Fullerton (10).

1.1.1. Taxonomía

Stover (1,4,,9,11) identificó por primera vez a *Mycosphaerella fijiensis* como el hongo causante de la Sigatoka Negra. *M. fijiensis* fue descrita como un hongo ascomiceto heterotálico por Leach en 1964.

División: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Capnodiales

Familia: Mycosphaerellaceae

Género: Mycosphaerella

Especie: *Mycosphaerella fjiensis* Morelet

1.1.2. Ciclo de Vida

Mycosphaerella fijiensis posee dos tipos de ciclos de vida simultáneos: el ciclo sexual y el asexual. El primero ocurre con mayor frecuencia y es el más importante en la evolución del patógeno, ya que permite el traspaso de genes, importantes para la sobrevivencia del hongo, a su descendencia (8). El segundo es de menor importancia debido a que este no influye en cambios genéticos en la especie pero sirve en caso que el hongo no encuentra un organismo con el cual aparearse.

1.1.2.1. Reproducción

El hongo, *M. fijiensis*, se reproduce asexualmente y sexualmente, formando conidios y ascosporas respectivamente, ambas con la capacidad de infectar las hojas de banano (1,2,4,9,11). Los conidios y ascosporas se forman bajo condiciones de alta humedad; entre los meses enero y mayo principalmente. Debido a su abundancia y pequeño tamaño, las ascosporas son más importantes que los conidios al dispersar la enfermedad entre plantas y dentro de las plantaciones (1,4).

La reproducción sexual se da por compatibilidad o tipo de "sexo" mating (acoplamiento). Solo líneas de "mating" opuestos son capaces de cruzarse y producir ascosporas. La recombinación heterotálica, crea un alto potencial para que ocurran cambios genéticos dentro de las poblaciones de *M. fijiensis,* lo que puede conducir a una rápida adaptación a las condiciones ambientales (7). Ambas fases de reproducción, asexual (anamorfa) y sexual (telomorfa), pueden estar presentes en las hojas infectadas. Es así como, a través del uso de hojas de banano infectadas para diversos propósitos, se diseminó la enfermedad de un continente a otro (12). La alta tasa de variación genética (0,59) (4) está dada por la reproducción sexual en el hongo, siendo esta la forma dominante de la reproducción de *M. fijiensis* (12).

El ciclo sexual comienza con la producción de un espermogonio en las lesiones foliares necróticas (Fig. 4). El rol preciso de esta estructura, no ha sido del todo establecido, pero se cree que su principal función radica en acercar a las hifas receptivas para la fusión nuclear y la formación de un peritecio (1,8,13). Los peritecios se desarrollan en las manchas maduras y coalescentes con su centro deprimido, con cada peritecio las ascas madura gradualmente, uno a la vez, incluso en épocas de sequía. Bajo condiciones favorables las ascas pueden ser producidas dentro de 2 semanas de haber aparecido los estadios primarios de infección, los cuales se muestran como pequeñas manchas en el envés de las hojas. Dentro de pocos minutos de humedad en la lámina foliar, después de una lluvia, las ascosporas se descargan del asca madura y se diseminan por la corriente de aire. Estas pueden liberarse hasta por dos horas después que la lamina foliar se humecta (1,4).

Figura 4: Ciclo sexual y asexual de *M. fijiensis*

Elaborado por: La Sociedad Americana de Fitopatología (3).

El ciclo asexual de *M. fijiensis* se basa en la producción de conidiosporas (Fig. 4). Las conidias se forman diariamente, indistintamente, durante periodos de alta humedad y épocas secas (1,4). En *M. fijiensis* las conidias se forman en grupos conocidos como esporodoquias, en la cavidad estomática de la parte inferior de las hojas. Estas conidias pueden dispersarse con la ayuda del agua y del viento (14). Una vez en dispersión estas conidias solo pueden sobrevivir hasta su germinación por pocas horas (4).

1.2. Mecanismos de infección y dispersión

Jones y Alcom (14) sugieren dos posibles formas de dispersión para el hongo *M. fijiensis*: a) La primera implica a las corrientes de los vientos como medio de dispersión de las ascosporas[1] y conidios[2] del hongo entre los continentes; y b) La segunda señala a la introducción por el hombre del material vegetal infectado (10). La dispersión por vientos concuerda con investigaciones directas de dispersión, que muestran la importancia del viento en la propagación de las ascosporas y conidios de los *Mycospaerella spp.* entre plantas y plantaciones a nivel local y global(10). Estas investigaciones también han demostrado que la dispersión por vientos puede ocurrir en cortas y largas distancias (10,14).

---

1 Esporas sexuales contenidas en ascus (pequeños sacos) necesarias para la reproducción.

2 Esporas asexuales comúnmente llamadas conidiosporas que al igual que las ascosporas son necesarias para la dispersión biológica.

Asumiendo que la dispersión de las ascosporas se realiza en una cantidad inmensurable para no diluirse y perderse en la atmósfera, éstas todavía tienen que enfrentarse a diferentes problemas durante el transporte, como la temperatura y la radiación ultravioleta. Las altas temperaturas destruyen las paredes de las esporas y desnaturalizan el ADN, y la radiación ultravioleta puede también desnaturalizarlo dependiendo de su longitud de onda (250-270 nm) (14).

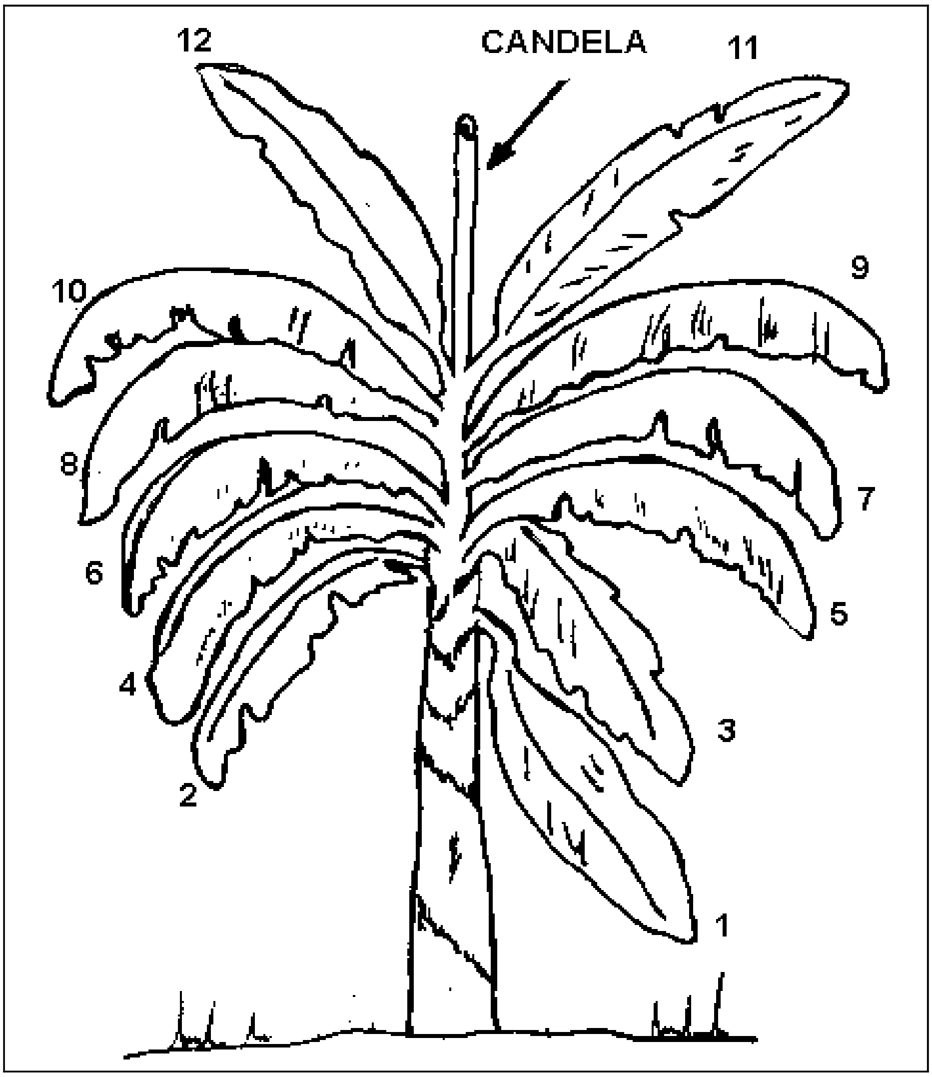
A pesar de las adversidades que el hongo debe pasar para su dispersión, la literatura deja bien claro que éste tiene la capacidad de hacerlo en cortas y largas distancias (10,14). Dicha dispersión ha sido comprobada mediante análisis en laboratorios de parentesco a nivel del ADN en diferentes regiones del mundo (4,10,14).

El segundo medio de dispersión, implican a las hojas infectadas de *M. fijiensis*, utilizadas en materiales de empaque, como responsable de infecciones a larga distancia.

El proceso de infección empieza una vez que el hongo llega a su huésped, sin importar la etapa del ciclo sexual que provenga. El hongo infecta las hojas por los estomas. Una vez que alcanza la madurez sexual, se reproduce y vuelve a infectar al siguiente huésped (4). Las esporas usualmente germinan dos o tres horas después de su descarga en la superficie húmeda de una hoja y el tubo germinativo[3] penetra en el estoma de la hoja a las 48-72 horas requiriendo una lámina de agua en la superficie, siendo así la humedad de la hoja y del ambiente factores críticos para su desarrollo (1,4). La mayoría de las infecciones se establecen en las hojas más jóvenes (las tres primeras) y en la hoja cigarro o candela (1,4) (Fig. 5).

[3] Hifa resultante de un sobre crecimiento de la pared y el citoplasma de la espora después de la germinación.

Figura 5: Hoja candela o cigarro de una planta de banano y numeración de sus hojas.



Fuente: Centro Nacional de Cálculo Científico de Venezuela (15)

El tiempo entre la infección y el primer síntoma en la hoja, que es cuando se observan pequeñas manchas marrones oscuras en el envés de la hoja, es alrededor de 10 a 14 días bajo un sistema de desarrollo ideal lo que requiere una temperatura de entre 25-28 °C y humedad óptima (92-100%), tanto en la planta como en el ambiente (4).

1.3. Genes de apareamiento

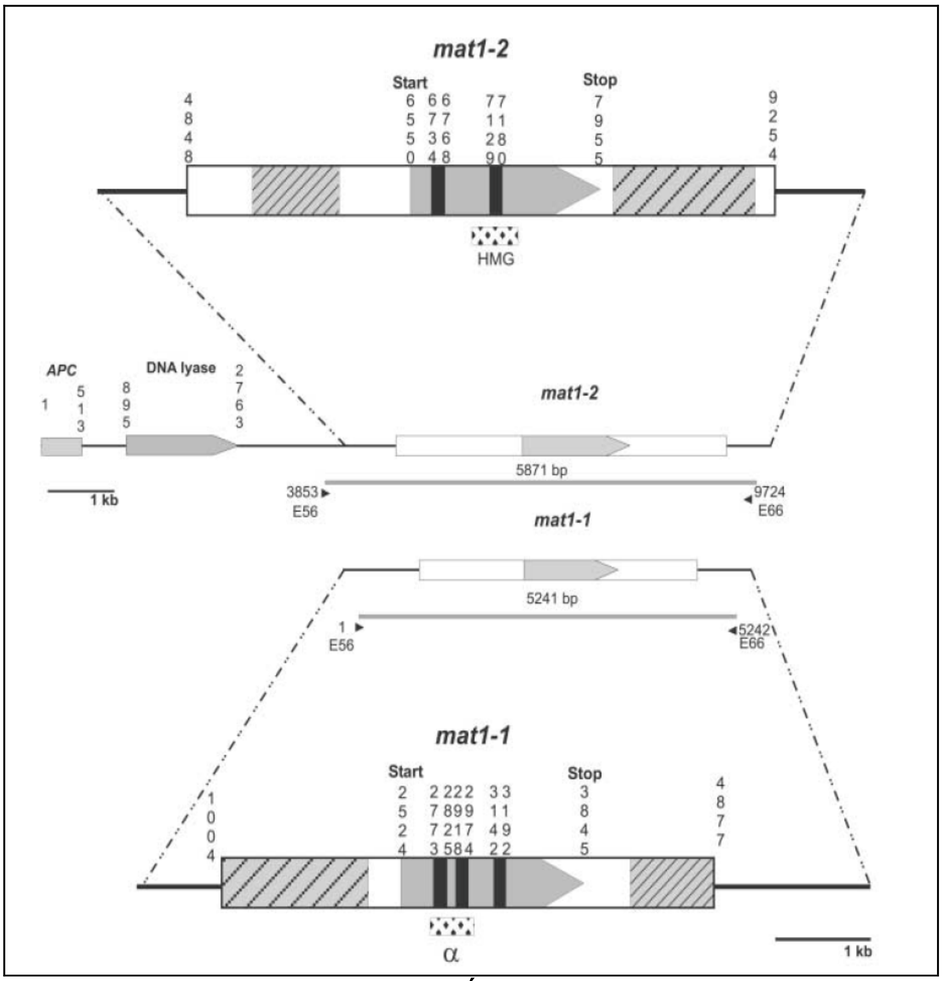
La reproducción sexual de los hongos se lleva a cabo por la fusión de núcleos sexualmente compatibles para la posterior producción de esporas diploides (6,13). La compatibilidad reproductiva está determinada por un sitio particular del genoma fúngico denominado locus MAT, que define el tipo sexual o “mating type” del hongo (5,7,8,13). En la mayoría de los ascomicetos, existe un solo locus definitorio del tipo de apareamiento, con dos formas alternativas (ideomorfos), por lo que el apareamiento es bipolar.

El locus MAT determina el tipo sexual de los hongos. En los ascomicetos, el estudio de la estructura genética del locus ha ayudado a elucidar aspectos de la evolución de las especies heterotálicas y homotálicas (5,7,10,13). Los genes MAT tienen el potencial de delimitar las fronteras entre especies, y ser útiles en estudios evolutivos y para establecer filogenia (5,7). La reproducción sexual tiene una enorme repercusión en la genética poblacional de la *M. fijiensis* por el intercambio genético que esta conlleva; así como contribuir en futuros estudios de prevención y tratamiento de las enfermedades que provoca (7).

Aunque los hongos, con pocas excepciones, son hermafroditas, existen especies autocompatibles (homotálicas) y autoincompatibles (heterotálicas) (5,13). *M. fijiensis* pertenece al grupo de los hongos autoincompatibles (heterotálicos) (13). Muchas especies de ascomicetos son homotálicas, capaces de autofecundarse y completar su ciclo de vida sexual sin necesidad de otra línea para aparearse (7,8,13).

La reproducción sexual contribuye a la variación genética y a la evolución de *M. fijiensis* (6,12). En este organismo el cruce sólo se puede dar en organismos que tengan líneas de “sexo” opuestas (5,7,8). El tipo de “mating” depende de los genes que se encuentran en el locus MAT. Los loci MATs se definen genéticamente por la segregación en la progenie de elementos que controlan el desarrollo y la producción de esporas sexuales (8). A las secuencias que se encuentran dentro del locus MAT se las denomina “idiomorfos” y no “alelos”, por tratarse de secuencias muy diferentes que, sin embargo, ocupan el mismo locus en el genoma (5). Los genes del locus MAT poseen regiones que se conservan entre especies distantes. Las regiones “Caja HMG” (en el idiomorfo Mat1-2 también llamado Mat-2) y “Caja alfa” (en el idiomorfo Mat1-1 también llamado Mat-1) son ejemplos característicos de conservación genética en este locus (Fig. 6).

Figura 6: Cajas HMG y alfa en *M. fijiensis*



Elaborado por: L. CONDE-FERRÁEZ et al. (5)

Los productos de los genes en el locus MAT son feromonas o factores de transcripción que controlan la producción de feromonas y son detectados por los receptores que se encuentran en la membrana celular del organismo con un “tipo de sexo” opuesto (7).

En el locus MAT del hongo *M. fijiensis* se pueden encontrar dos idiomorfos. Estas secuencias distintas se llaman Mat1-1 y Mat1-2 y que se encuentran insertadas en regiones comunes dentro de la especie (5,7).

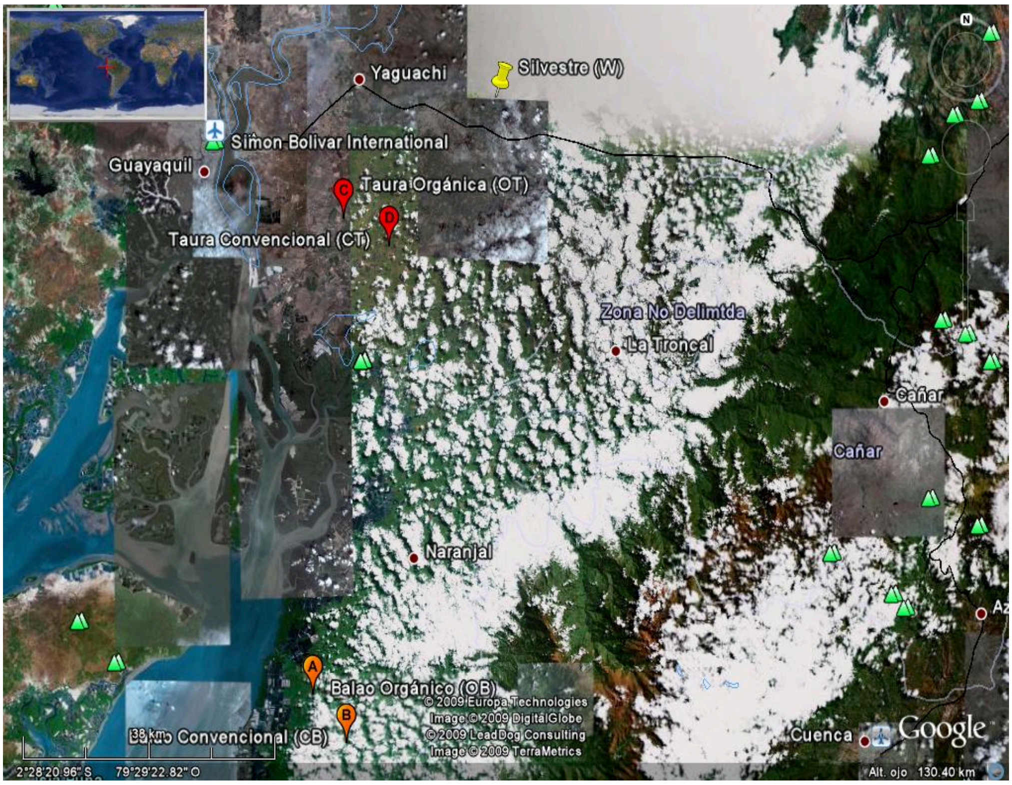
CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Los asilados de *M. fijiensis* fueron los utilizados en la investigación del Ing. Chong en el 2007 (4) y obtenidos del banco de ADN del CIBE. Las cepas estuvieron localizadas en 3 diferentes zonas de la provincia del Guayas (Fig. 7): Los aislados de hongos monospóricos Silvestres **(W)**, provienen de la zona conocida como Mariscal Sucre (S 2°6'45,91" W 79°30'13.27") del cantón Balao de una hacienda con manejo orgánico **(OB)** (S 2°50'16.90'' W 79°45'03.80'') y de otra con manejo convencional **(CB)** (S 2°53'50'' W 79°42'21''). Los aislados de hongos monospóricos provinieron de haciendas localizadas cerca del cantón Taura con control convencional **(CT)** (S 2°18'35.76'' W 79°44,3'53.48'') y otra hacienda con manejo orgánico **(OT)** (S 2°15'35.37'' W 79°42'34.58''), ubicada en el Km. 24 Vía Duran-Tambo.

Figura 7: Ubicaciones geográficas de las localidades muestreadas



Obtenida de: Google Earth

Leyenda: **A)** OB **B)** CB **C)** OT **D)** CT **W)** W

Los asilados de *M. fijiensis* fueron los utilizados previamente en la investigación realizada en el CIBE llamada: “Diversidad genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis Morelet* provenientes de haciendas bananeras con manejo orgánico y convencional”; para la obtención del grado de Magister en Biotecnología Agrícola por parte del Ing. Pablo Chong. Los aislados de hongos monospóricos fueron tomadas de haciendas que llevaban un control convencional y orgánico para lograr un mejor entendimiento de la diversidad genética de las poblaciones y así conocer el desplazamiento de genes de una comunidad a otra y entre comunidades.

El estudio se realizó tomando un aproximado de 15-18 aislados de hongos monospóricos de hojas de banano infectadas con Sigatoka Negra por ubicación, para lograr un total de 81 aislados de hongos monospóricos en la provincia del Guayas.

2.2. Métodos

2.2.1. Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis*

El protocolo utilizado para realizar el cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* fue tomado de un protocolo interno del CIBE $_{(4)}$ y se describe de la siguiente manera:

a) Los aislados de hongos monospóricos son obtenidos por media de la descarga de las hojas infectadas. (Protocolo interno estandarizado CIBE)

b) Se selecciona una espora y se coloca en medio PDA. Anexo 3 (Protocolo interno estandarizado CIBE)

c) Se deja crecer la colonia por el lapso de una o dos semanas y luego es re-inoculada en un medio líquido enriquecido (medio V8). Anexo 3

d) Se colocan los medios inoculados en una zaranda a 120 RPM durante 10 a 15 días a temperatura ambiente.

e) El micelio del hongo es filtrado en papel filtro de 2 µm estéril, se lava con agua destilada tibia 30 - 40°C y es secado a 60°C durante 48 horas.

2.2.2. Protocolo de extracción de ADN

El protocolo usado para la extracción de ADN del hongo *Mycosphaerella fijiensis* es el descrito, modificado y adaptado por el Dr. Efrén Santos en el 2008(16).

a) Extraer 50 mg del hongo seco obtenido en el protocolo de cultivo de *M. fijiensis.*

b) Pulverizar el tejido seco utilizando un mortero hasta obtener un polvo muy fino y transferir a un tubo de eppendorf de 2ml.

c) Adicionar 1 ml del buffer de extracción (concentración final):

100 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA, 500mM NaCl,

10 mM 2-β-ME y 2% PVP10.000

d) Adicionar 80 µl al 20% de SDS (1.32% final) o 53 µl al 30% de SDS (1.32% final) al tubo de 2 ml; colocar el tubo en el vortex e incubar por 10 minutos a 55 °C.

e) Adicionar 330 µl 5 M de acetato de potasio (1.17 M final), colocar en el vortex brevemente, centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C.

f) Transferir el sobrenadante (SN) a un nuevo tubo, evitando los restos celulares.

g) Adicionar 750 µl de 6 M NaCl al SN, vortex 30 segundos.

h) Adicionar RNAsa (200 µg/ml concentración final) al SN por 15 minutos a 37 °C.

i) Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C y transferir el SN a un nuevo tubo eppendorf (resistente al cloroformo).

j) Adicionar al nuevo SN un volumen igual de cloroformo - isoamil alcohol (24:1) e invertir el tubo varias veces. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos y transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo.

k) Adicionar un volumen igual de isopropanol al SN, mezclar bien e incubar las muestras a -20 °C por lo menos por 30 minutos (menos tiempo a menor temperatura). El protocolo puede detenerse en este punto, almacenando las muestras a -20 °C.

l) Centrifugar a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos.

m) Lavar el pellet con etanol al 70% (centrifugar por 5 minutos a 4 °C) y secar brevemente (por ejemplo en un flujo laminar).

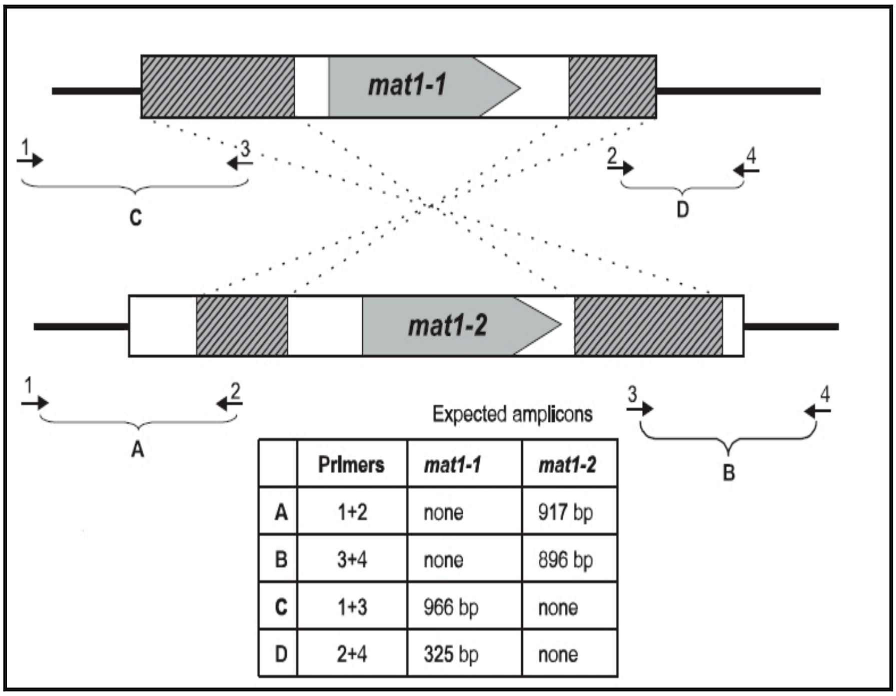
n) Disolver el pellet en 50-300 µl de agua ultrapura o buffer TE dependiendo de la cantidad de ADN obtenida para facilitar la disolución.

o) Determinar concentración y calidad de ADN mediante un gel de agarosa 1% y/o espectrofotómetro a 260/280 nm de longitud de onda.

2.2.3. PCR Multiplex

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del tipo Multiplex para esta experimentación utilizó un protocolo con 2 diferentes pares de primers, en la misma reacción y de manera simultánea para amplificar los flancos de la caja alfa y la caja HMG (Fig. 8). Los primers fueron tomados de un estudio preliminar $_{(2)}$ en donde obtuvieron amplicones de los siguientes tamaños descritos en la Figura 8:

Figura 8: Amplicones esperados del locus MAT de *M. fijiensis*



	Primers	*mat1-1*	*mat1-2*
A	1+2	none	917 bp
B	3+4	none	896 bp
C	1+3	966 bp	none
D	2+4	325 bp	none

Elaborado por: L. CONDE-FERRÁEZ et al. (8)

* Los primers son los siguientes:

1. **F1 flan4739-F**

   5′-GCGGTTTTGGAGCGGTCAGG-3′

2. **R1 inver5656-R**

   5′-GAAGCTCTGGGTATCTCAGCACAGG-3′

3. F2 inver8486-F

5′-GCACCTCAGGGAGGCATTGG-3′

4. R2 flan9352-R

5′-TGATGCATCCTGCCGAGACC-3′

Para realizar la PCR se utilizaron las concentraciones descritas en la tabla 1, y para el programa de PCR se utilizó lo expuesto en la tabla 2.

Tabla 1: PCR Mix

Solución stock	**Concentración final**	**Volumen**
Tampón Taq. 10X	1X	2,5 µL
$MgCl_2$ 50 mM	2,00 mM	1 µL
dNTPs 10 mM	0,20 mM	0,5 µL
*Primer F1 10 µM	0,24 µM	0,6 µL
* Primer R1 10 µM	0,24 µM	0,6 µL
* Primer F2 10 µM	0,24 µM	0,6 µL
* Primer R2 10 µM	0,24 µM	0,6 µL
Taq DNA polimerasa	1 U	0,33 µL
M. fijiensis DNA	5 – 10 ng/µL	2 µL
H_2O deionizada	-	16,27 µL
TOTAL	-	25,00 µL

Modificado por: Julio Bonilla
Fuente: CHONG P (4).

El kit utilizado para realizar la PCR fue de la marca INVITROGEN modelo “Platinum® PCR SuperMix High Fidelity”.

Tabla 2: Programa de PCR

	Temperatura	**Tiempo**
Inicialización	94 °C	1 min
30 Ciclos:		
Desnaturalización	94 °C	1 min
Alineamiento	62 °C	40 seg
Extensión	72 °C	40 seg
Elongación Final	72 °C	7 min
Conservación	4 °C	∞

Modificado por: Julio Bonilla
Fuente: CONDE L. (5)

2.2.4. Análisis de datos

El análisis de los datos fue realizado utilizando el programa de análisis estadístico "Infostat", obtenido de la pagina web www.infostat.com.ar con la última versión del día 17 de diciembre de 2008. Con la ayuda de este programa los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente para tener una mejor comprensión de los datos y entender de manera profunda si las variables dependen las unas de las otras de alguna manera o si son totalmente independientes. Para estos análisis se realizaron tablas de contingencia para analizar el tipo de alelo encontrado versus el tratamiento al que se encontraba expuesto y de la misma manera se analizó el tipo de alelo versus la localización geográfica de donde provenía la muestra de hongo.

A su vez con los resultados de las tablas de contingencia se realizaron análisis estadísticos basados en el método de X^2 de Pearson. La prueba de X^2 de Pearson es una prueba que se utiliza para probar la independencia de dos variables entre sí, mediante la presentación de los datos en tablas de contingencia. Mientras mayor sea el valor de X^2, menos verosímil es que la hipótesis sea correcta. Lo que quiere decir que mientras mayor sea el valor encontrado en la prueba de X^2 se rechaza la hipótesis planteada. Para este estudio las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

- H_0=Tipo de alelo es independiente de Tratamiento.
- H_0=Tipo de alelo es independiente de Localización.

Se realizó también un análisis de correspondencia el cual es un análisis descriptivo de estadística multivariada que solo nos demuestra de manera gráfica la relación entre la zona, el tratamiento y los tipos a través de los datos obtenidos. Con la ayuda del programa se determinaron los intervalos de confianza para los alelos sexuales Mat 1-1 y Mat 1-2 con un nivel de confianza del 95% para que se ajustara de la mejor manera a la experimentación para lograr conseguir un intervalo de confianza que determine que de cada 100 procesos, 95 obtendrán el resultado esperado. Estos intervalos son los indicadores de la seguridad que las frecuencias alélicas encontradas en la investigación se repetirán en futuras pruebas.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Resultados y discusión

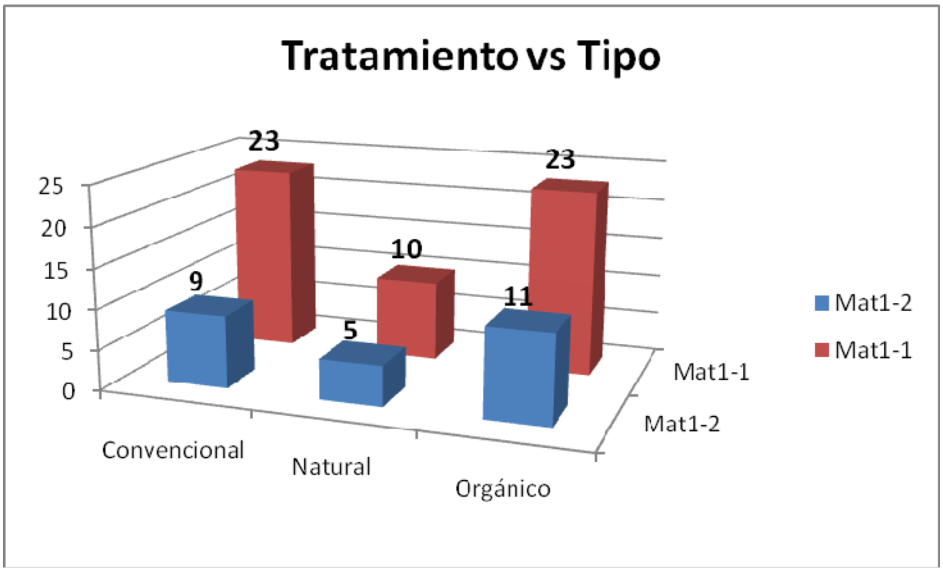
Los resultados de los geles de agarosa donde se determinaron la presencia de los genes de apareamiento Mat 1-1 y Mat 1-2 están presentes en los anexos. De los datos analizados se determinó que la relación entre los genes MAT 1-1 y MAT 1-2 es 2:1 respectivamente. La población analizada fue de 81 individuos obteniendo así 56 aislados de hongos que poseían el alelo MAT 1-1 y 25 el alelo MAT 1-2. De manera detallada los resultados obtenidos se encuentran descritos en la tabla 3:

Tabla 3: Resultados de Muestras analizadas

Lugar\Alelo	MAT 1-1	MAT 1-2	TOTAL
W	10	5	15
OT	12	6	18
CT	11	5	16
OB	11	5	16
CB	12	4	16

En base a estos resultados obtenidos se realizaron tablas de contingencia para entender si las variables (el tipo de alelo, la ubicación geográfica y el tipo de tratamiento) dependen las unas de las otras de alguna manera o si son totalmente independientes.

Figura 9: Figura del Tratamiento VS el Tipo de alelo detectado



En la figura 9 se encuentran ilustrados los datos del tipo de alelo versus el tratamiento que estas muestras recibían determinando que la proporción es de 2:1 para los Mat 1-1 y Mat 1-2 respectivamente.

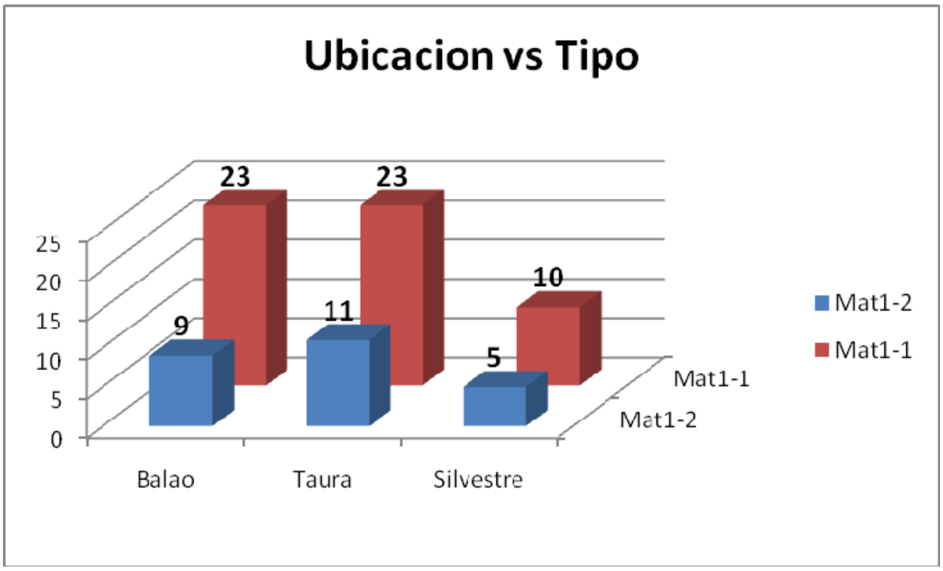
Basados en los valores de la figura 9 se realizó la prueba de X^2 de Pearson obteniendo los valores descritos en la tabla 4.

Tabla 4: Tabla del valor de X^2 para el tratamiento y el tipo de alelo

Estadístico	Valor
X^2 Pearson	0,19

Para analizar el tipo de alelo versus la ubicación de la muestra se hizo una prueba similar a la anterior con nuevos parámetros descritos en la figura 10:

Figura 10: Gráfico de la zona VS el Tipo de alelo estudiado



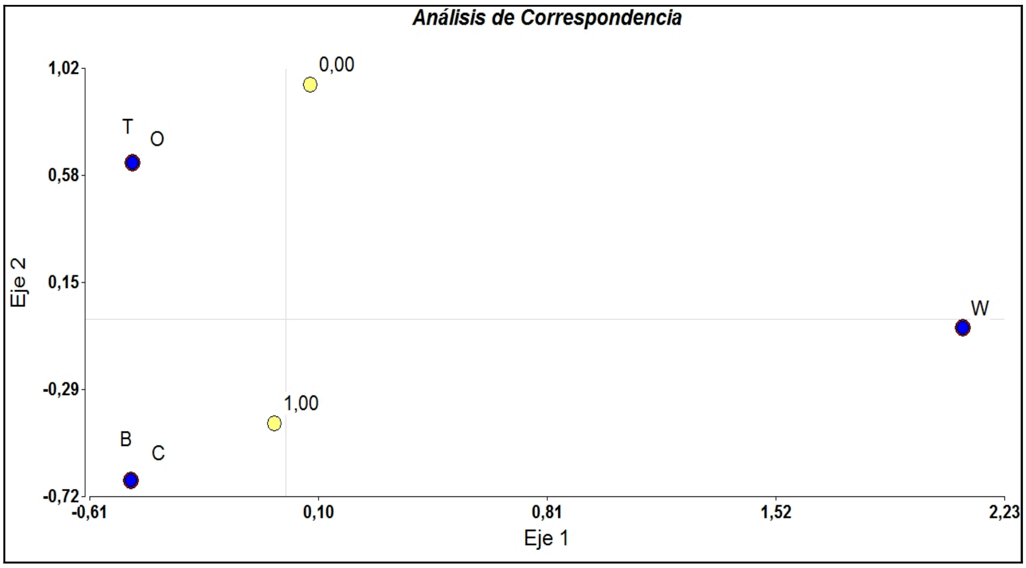
Asimismo se demostró que la proporción fue de 2:1 para los Mat 1-1 y Mat 1-2 respectivamente y que el tipo de alelo es independiente de la zona donde se encuentra la muestra (Tabla 5).

Tabla 5: Tabla del valor de X^2 para la zona y el tipo de alelo

Estadístico	Valor
X^2 Pearson	0,19

En la figura 11 se demostró que el tipo de alelo obtenido es independiente de su ubicación y del tratamiento utilizado para controlar el hongo.

Figura 11: Gráfico del análisis de correspondencia



Los puntos amarillos numerados como 0 y 1 representan a los alelos Mat 1-1 y Mat 1-2 respectivamente. Los puntos mostrados como T, B y W representan a Taura, Balao y Silvestre respectivamente mientras que O, C y W representan a orgánica, convencional y sin tratamiento como corresponden. La distancia entre las tipos de alelos y el tratamiento y localización indica que el tipo de tratamiento y la ubicación geográfica de las cepas de hongos muestreadas no tienen ninguna influencia sobre el tipo de alelo que los hongos posean.

Los 81 aislados de hongos monospóricos tomadas de la provincia del Guayas sirvieron para la obtención de la frecuencia alélica de los idiomorfos sexuales del hongo descrito en la tabla 6.

Tabla 6: Tabla de la frecuencia alélica

<table>
<tr><th></th><th>Frecuencia alélica</th><th>Desviación estándar</th></tr>
<tr><td>Mat 1-1</td><td>0,69135802</td><td rowspan="2">0,05132589</td></tr>
<tr><td>Mat 1-2</td><td>0,308641975</td></tr>
</table>

Se determinó la desviación estándar de los aislados de hongos monospóricos diciendo que los datos están poco alejadas de la media de los resultados (tabla 6).

La frecuencia alélica obtenida fue de 0,691 para los genes MAT 1-1 y de 0,308 para los genes MAT 1-2. Los intervalos de confianza para los genes MAT 1-1 fue 0,79 - 0,59 y para MAT 1-2 es 0,41 - 0,21. Estos intervalos de confianza nos indican que para una próxima experimentación realizando los mismos pasos de ejecución, los resultados de las frecuencias alélicas estarán dentro de estos valores o intervalos para cada una de las poblaciones con un 95% de certeza.

La investigación realizada por el M. Sc. Pablo Chong en el 2007 concluyó que existe un alto flujo genético entre las 5 poblaciones $_{(4)}$ analizadas, motivo por el cual las poblaciones se encuentran emparentadas y los resultados obtenidos en la investigación actual poseen frecuencias alélicas similares de los alelos de apareamiento Mat 1-1 y Mat 1-2.

El hongo *M. fijiensis* necesita de individuos de padres distintos y a su vez de individuos que posean los alelos alternos para poder realizar una reproducción sexual exitosa $_{(7)}$. La reproducción asexual del hongo crea individuos iguales del cual provienen lo que quiere decir que si el organismo “original” es Mat 1-1 su progenie por reproducción asexual será también Mat 1-1 $_{(8)}$. Los genes apareamiento Mat 1-1 y Mat 1-2 logran que la recombinación de genes no quede dentro de su propio línea sino el poder intercambiar sus genes con otros individuos de la misma población y de esta manera segregar ya sean sus genes de resistencia, tolerancia y/u otros.

Los resultados obtenidos e ilustrados en las figuras 9, 10 y 11 nos indican que indiferente de donde provengan las cepas de hongos y el tratamiento que estas reciban, esto no altera los alelos sexuales que la *M. fijiensis* tendrá. Estudios realizados en Costa Rica $_{(17)}$ sobre la frecuencia alélica de los genes de apareamiento en Sigatoka Negra dieron resultados diferentes a los obtenidos en la provincia del Guayas pudiendo esto deberse a factores como la situación climática y/o a la presión de selección ejercida por los controles orgánicos o por las sustancias químicas utilizadas contra la enfermedad en el país del norte que es mucho mayor a la de nuestra zona muestreada. Es importante acotar que los resultados obtenidos fueron de una sola provincia del Ecuador y comparados con los de un país.

Con estos resultados salta a la mente una pregunta muy importante: "¿Cuál es entonces la población efectiva de *M. fijiensis* en la provincia del Guayas?". Como todo en la naturaleza, nada es perfecto y por ende no todos los organismos disponibles para el apareamiento son hábiles sino que existirán algunos estériles, habiendo dicho esto y conociendo que en el Guayas la relación entre los genes MAT 1-1 y MAT 1-2 es 2:1 respectivamente, se puede decir entonces que en una población el número de la descendencia dependerá de los poseedores de los genes MAT 1-2, esto es porque al haber menos individuos con este tipo de alelo será un factor limitante, sin tomar en cuenta aún a los individuos estériles, indistintamente si estos son MAT 1-1 y/o MAT 1-2.

Este tipo de relaciones pueden llevar a la extinción de una especie ya que si la esterilidad se encontrara en los poseedores del alelo MAT 1-2 las posibilidades de reproducirse de manera sexual para el hongo *M. fijiensis* serían menores. Pero conocemos que *M. fijiensis* no se está extinguiendo y que es una enfermedad foliar que tiene mucha incidencia en la producción bananera de nuestro país, "¿Por qué entonces esta relación no afecta la existencia del hongo?". La respuesta puede deberse a que esta relación es una manera del hongo de asegurar que la progenie sea la más apta para la sobrevivencia y esta cantidad de individuos es capaz de asegurar el futuro de *M. fijiensis*.

CONCLUSIONES

1. La relación entre las frecuencias de los genes en los alelos sexuales MAT 1-1 y MAT 1-2 de *Mycosphaerella fijiensis* encontrados en la provincia del Guayas es de 2:1 respectivamente.

2. La relación encontrada entre las frecuencias de los alelos sexuales difieren de las reportadas según la literatura, que para el caso de Costa Rica fue de 1:1, publicada por el Dr. Gert Kema $_{(17)}$.

3. La existencia de los genes de apareamiento MAT 1-1 y MAT 1-2 evita la endogamia en la especie del hongo, alentando a la recombinación sexual de individuos no emparentados.

4. No existe una correlación directa entre el tipo de presión de selección , causada por el tipo de control y/o la ubicación geográfica, y la proporción de la frecuencia de los alelos MAT 1-1 y MAT 1-2, que en todos los casos fue de 2:1, como se muestra en los análisis estadísticos con 95% de certeza.

5. No es posible discernir una relación entre el tipo de control y la ubicación geográfica con la proporción que existe entre los alelos MAT 1-1 y MAT 1-2.

RECOMENDACIONES

1. Se debería realizar el experimento con un mayor número de aislados de hongos monospóricos y en más localidades para validar y ampliar los resultados obtenidos.

2. Realizar el mismo estudio en cada una de las principales provincias productoras de banano para ver si los resultados son replicables.

3. Realizar el estudio a nivel de toda la zona bananera del Ecuador para poder obtener resultados comparables con otras naciones.

4. Sería importante realizar estudios de recombinación sexual dirigida de *Mycosphaerella fijiensis*.

5. Se recomienda analizar cómo la relación de los genes de apareamiento de *Mycosphaerella fijiensis* afecta la población sexual efectiva de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

1. JIMENEZ M. 2008. “Effect of the nutritional status of Banana (*Musa spp.)* on leaf disease infestation by *M. fijiensis* Morelet in Ecuador”. Tesis para la obtención del grado de doctora en Bioingeniería.

2. SUQUILANDA, M. 2001. “Manejo Alternativo de Sigatoka Negra”. Cultivos Controlados. Volumen 3 # 5.

3. The American Phytopathological Society. 2005. Elaborado a partir de CARLIER J. 1994. ”Estudio de poblaciones, mediante RFLP, de *Mycosphaerella fijiensis*, agente responsable de la enfermedad de rayas negras en bananos”

4. CHONG P. 2007. “Diversidad genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis Morelet* provenientes de haciendas bananeras con manejo orgánico

y convencional". Tesis de grado para la obtención de magister en biotecnología agrícola.

5. CONDE L, WAALWIJK C, CANTO B, KEMA G, CROUS P, JAMES A. y ABELN E. 2007. "Isolation and characterization of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana". Molecular Plant Pathology. Volumen 8(1), 111 – 120.

6. GALAGAN J., HENN M., MA Li-Jun, CUOMO C., BIRREN B. 2005. "Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology". Genome Research. 15:1620-1631, 2005

7. CONDE L. 2007. "El locus *MAT (mating-type)* de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación". Revista Iberoamericana de Micología. 24: 95-99

8. WARE S., DÍAZ – TRUJILLO C., KEMA G., VAN DER LEE T., DE WAARD M. 2006. "Aspects of sexual reproduction in Mycosphaerella species on wheat and barley: genetic studies on specificity, mapping, and fungicide resistance". PhD thesis Wageningen University, The Netherlands, ISBN 90-8504-527-4 Chapter 2: 34, Chapter 5: 102 – 104; 114 – 119.

9. MEREDITH D.S., LAWRENCE J. 1969. “Black leaf strike disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii and notes on the conidial state of the casual fungus.” Transacciones de la Sociedad Británica de Micología. 52: 559-476

10. RIVAS G, ZAPATER M, ABADIE C and CARLIER J. 2004. “Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fjiensis*”. Molecular Ecology. Volumen 13 (2): 471.

11. CARLIER J. 1994. ”Estudio de poblaciones, mediante RFLP, de *Mycosphaerella fijiensis*, agente responsable de la enfermedad de rayas negras en bananos”. Tesis para la obtención del grado de doctor en ciencias.

12. CARLIER J., LEBRUN M.H., ZAPATER M.F., DUBOIS C., MOURICHON X. 1996. “Genetic structure of the global population of Bananas black leaf streak fungus *Mycosphaerella fjiensis*”. Molecular Ecology. 5:499-510

13. SOUZA C, SILVA C, FERREIRA A. 2003. “Sex in fungi: lessons of gen regulation”. Genetic Molecular Research. Volumen 2 (1): 136-147.

14. BURT P.J.A. 2003. “Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*”. 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases, San José (CRI), 2002/05/20-23.

15. ABLAN M, ANDRESSEN R, BRACHO T, CASNOVA E, NUNEZ L. 2000. “Sistema de información Bioclimática del Lago de Maracaibo. Pronóstico de plagas y estudio de “Chubascos””. Informe de labores de CeCalCULA.

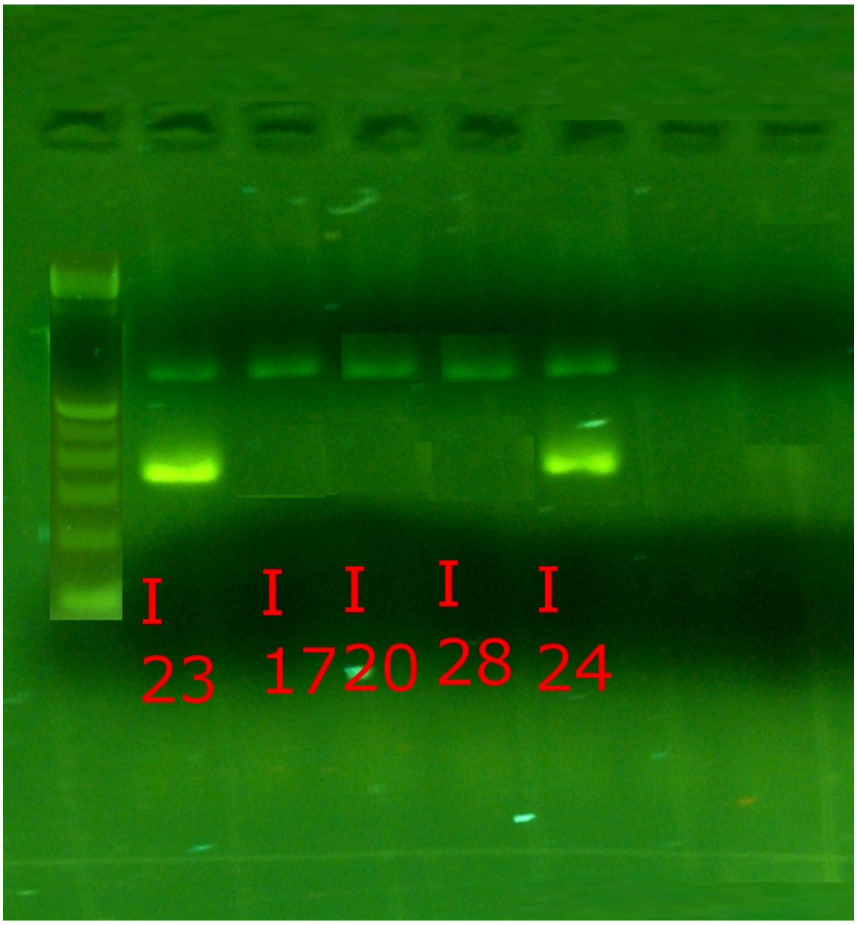
16. SANTOS E. 2008. “Characterization and isolation of T-DNA tagged banana promoters active during in vitro regeneration and low temperature stress”. Tesis para la obtención del grado de doctora en Bioingeniería.

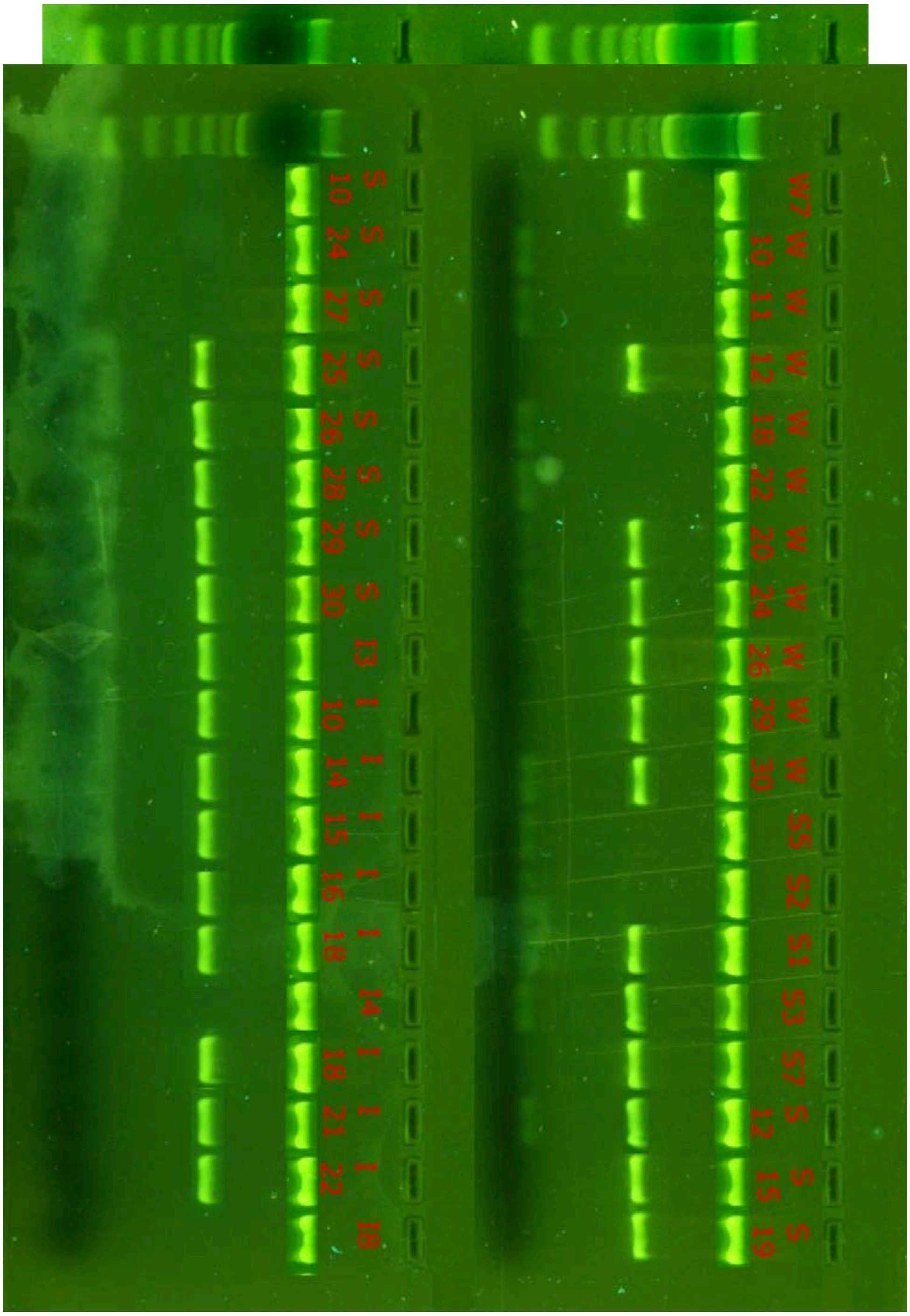
17. KEMA G. 2008. “Molecular characterization of *Mycosphaerella fijiensis* isolates from Costa Rica”. Comunicación personal del Dr. Gert Kema. Gert.kema@wur.nl.

ANEXOS

Anexo 1

Foto de los resultados de las experimentaciones





S 10
S 24
S 27
S 25
S 26
S 28
S 29
S 30
I3
I 10
I 14
I 15
I 16
I 18
I4
I 18
I 21
I 22
I8
W7
W 10
W 11
W 12
W 18
W 22
W 20
W 24
W 26
W 29
W 30
S5
S2
S1
S3
S7
S 12
S 15
S 19

Simbología:

W	= Muestras del hongo Silvestre
MC	= Muestras de la hacienda María Cristina (CB)
SH	= Muestras de la hacienda San Humberto (OB)
I	= Muestras de Hacienda con tratamiento convencional (CT)
O	= Muestras de Hacienda con tratamiento orgánico (OT)

Anexo 2

Descripción de los estadíos del crecimiento de *M. fijiensis*.

Síntomas	Descripción
Estadío 1	Los síntomas ocurren inicialmente de manera poco notorios con unas pequeñas manchas (0.25mm de diámetro) de color café rojizo en el envés de la hoja de banano. Son más abundantes en cerca del margen de la hoja, particularmente hacia la punta.
Estadío 2	Las manchas se elongan, ensanchándose y formando una raya con cuerpo de color café rojizo de 20 x 2 mm con el eje alargado paralelo a las venas de la hoja. Las líneas son más visibles sobre el envés de la hoja que sobre su superficie y la distribución de la hoja es variable. El número de rayas puede ser numeroso y pueden juntarse varias rayas para formar una grande.
Estadío 3	La raya cambia de color de café rojizo a café oscuro volviéndose claramente visible en la superficie de la hoja. Cuando se encuentra muchas manchas y se encuentran más o menos distribuidas, la hoja se vuelve enteramente negra.
Estadío 4	La raya presenta los bordes más gruesos y la raya se vuelve fusiforme o elíptica. El borde de la mancha desarrolla un color café claro y con apariencia de húmeda.
Estadío 5	El área central café oscuro o negra de la mancha se deprime levemente y el borde con apariencia de húmedo se vuelve más

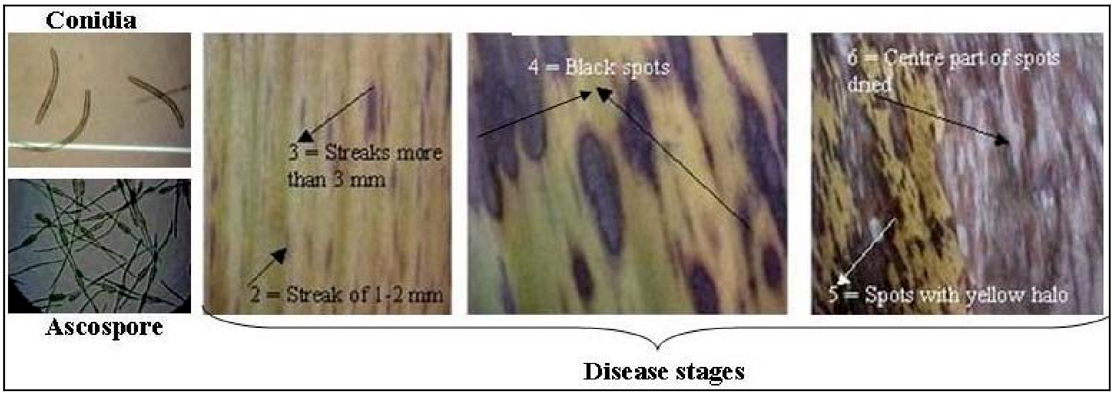
	pronunciado debido al oscurecimiento. Para este estadío puede aparecer un tejido amarillo de la hoja alrededor del borde de la mancha.
Estadío 6	El centro de la mancha se seca totalmente volviéndose ligeramente plomo y muy deprimido. La mancha está rodeada por un angosto, bien definido borde oscuro. Entre el borde y el color verde normal de la hoja, a menudo existe una zona de transición de color amarilla brillante. Luego de la hoja haber colapsado y dañado, las manchas permanecen claramente visibles con centros blanquinosos y bordes oscuros.

Elaborado por: Meredith y Lawrence (9)

Anexo 3

Estadíos del crecimiento de *M. fijiensis*

Figura A: Síntomas de la enfermedad después de la germinación de la espora



Fuente: CIBE-ESPOL

Anexo 4

Preparacion de los medios de cultivo

Medio PDA

Agregar 39 gr. de agar PDA en un Litro de agua de - ionizada

Medio V8 líquido

Agregar 300 mL de jugo V8 + 3 gr. de $CaCo_3$ + 500 mL de agua de – ionizada en un vaso de precipitación con capacidad para un litro, hervir por 30 minutos y centrifugar a 2000 G durante 10 minutos. Recoja el sobrenadante y lleve el medio a un Litro.