

No existe en sistema 24/02

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

Proyecto de Investigación

Tema:

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceanicas y Recursos Naturales
Centro de Información Bibliotecaria

No. DE INVENTARIO: D-76557
VALOR: 4,00
CLASIFICACIÓN: 632 / FRE
FECHA DE INGRESO: 31/10/2017
PROCEDENCIA:
SOLICITADO POR:

“Análisis de Perfiles Metabolómicos mediante la cromatografía de gases en cepas de *Mycosphaerella fijiensis* resistentes a Thiabendazol”

PREVIO OBTENCIÓN AL TÍTULO:

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

ANDREA MARTHA FREIRE PEÑAHERRERA

ARTURO LUIS MORENO LUCIO



GUAYAQUIL-ECUADOR

AÑO 2015



A.F. 138363

D-76557
D-76557

Análisis de perfiles metabolómicos mediante la cromatografía de gases en cepas de *Mycosphaerella fijiensis* resistentes a Thiabendazol

Andrea Freire Peñaherrera^a, Arturo Moreno Lucio^a, María Maridueña Zavala^b, Juan Cevallos Cevallos^b

^aFacultad de Ciencias de la Vida, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaqui, Ecuador ^bCentro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador Escuela Superior Politécnica del Litoral, Km. 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador

Autores: amfreire@espol.edu.ec^a, arlumore@espol.edu.ec^a, gmaridue@espol.edu.ec^b, jcevallos@espol.edu.ec^b

Resumen. La actividad bananera en Ecuador, considerada como una de las fuentes económicas más importantes, es afectada por la presencia de una serie de enfermedades de origen fúngico como la Sigatoka Negra. La identificación de compuestos bioquímicos presentes en cepas de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de esta fitopatología, como respuesta a la acción de fungicidas como Thiabendazol es crucial para la generación de mecanismos de control puntualizados en su metabolismo. El uso de la herramienta de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas fue esencial para la detección de perfiles metabolómicos en muestras resistentes y susceptibles provenientes de 4 zonas del país. Los resultados mostraron que las provincias de Guayas y El Oro juntas son las más resistentes con un 80% superando a Esmeraldas y Oriente que presentaron un 20%. Se identificaron los 10 metabolitos que presentaron los valores factoriales de F1/F2 más altos según su origen donde se observó que la provincia de Esmeraldas tenía 2 compuestos para valores F1 (0,989); y la provincia de Guayas 3 compuestos para F2 (0,984).

Palabras Clave: Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*, cromatografía, metabolómicos, Thiabendazol

Abstract. The banana industry in Ecuador, considered one of the most important economic sources, it is affected by the presence of a number of fungal diseases such as Black Sigatoka. The identification of biochemical compounds found in strains of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of this pathology, in response to action as Thiabendazole fungicide is crucial for the generation of control mechanisms punctuated metabolism. Use of the tool gas chromatography coupled to mass spectrometry was essential for detection of metabolomic profiles in resistant and susceptible samples from four regions of the country. The results showed that the provinces of Guayas and El Oro together are the strongest with 80% beating Esmeraldas and East had 20%. 10 metabolites that showed factorial values F1 / F2 higher by origin where it was noted that the province of Esmeraldas had 2 compounds F1 (0.989) values were identified; and the province of Guayas three compounds F2 (0.984).

Keywords. Black Sigatoka, *Mycosphaerella fijiensis*, chromatography, metabolomics, Thiabendazole

INTRODUCCIÓN

El cultivo de plátano y banano (*Musa sp.*) en Ecuador son considerados como algunas de las actividades de mayor importancia dentro del ámbito económico, nutricional y social. Su producción bananera promedio desde 2006 hasta 2013, ha sido 6'85 millones de toneladas por año [1], constituyéndose como una de las principales fuentes de empleo en el país, ya que un 12% de su población depende directa o indirectamente de este sector [2]. El principal problema fitopatológico en la producción de musáceas [3] para el Ecuador, es la enfermedad de la Sigatoka negra causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*. Esta enfermedad consiste en el deterioro paulatino del área foliar del plátano influyendo negativamente en su acción fotosintética y su crecimiento. Su progreso está dirigido hacia el desarrollo de una fuerte necrosis [4], causando la madurez prematura de los frutos, provocando la disminución en la calidad y la producción [3].

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* presenta un alto nivel de diversidad genética debido a su reproducción sexual y ciclo de vida corto, lo que ha ocasionado numerosas generaciones por año y un elevado índice de recombinación genética [5].

Aunque los tratamientos con fungicidas han sido un componente clave en la gestión integrada de muchas enfermedades de las plantas como la Sigatoka negra, la aparición de la resistencia se ha convertido en un factor importante en la limitación de la eficacia y la vida útil de los fungicidas desarrollados a costos cada vez más altos [6]. En Ecuador el control químico corresponde del 40 a 60% del costo total de la producción [4] y sus consecuencias se reflejan en la contaminación al ambiente, deterioro de la salud humana, y la pérdida de sensibilidad del hongo a fungicidas sistémicos. [7].

El mecanismo de acción parece ser a través de la inducción de anomalías en la germinación de esporas, la multiplicación celular y el crecimiento como resultado de la interferencia en la formación de la tubulina [8]. La tolerancia y la resistencia adquirida del hongo *Mycosphaerella fijiensis* a los fungicidas pueden estar relacionadas a la acción selectiva que los fungicidas plantean, especialmente la acción selectiva bioquímica [9].

El análisis metabolómico por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) provee una alternativa para la detección de compuestos químicos sean estos de bajo peso molecular como de baja polaridad [10], [11]. Comúnmente, estos compuestos son liberados al medio donde crecen estos microorganismos y además de ello, no representan una importancia vital para ellos; siendo obtenidos ya sea de una fuente energética o de reserva, intermediarios o productos finales del metabolismo primario principalmente en etapas donde el crecimiento es lento y sostenido [12]. Esta herramienta ómica ha demostrado ser útil para la obtención de perfiles metabólicos en plantas cuyo propósito radica en conocer cómo actúa el patógeno a ciertas condiciones de estrés. Algunos estudios son evidencias de los resultados que se pueden obtener utilizando la técnica GC-MS para el estudio de microorganismos, tal es el caso de investigaciones que se han realizado en *Solanum tuberosum* en el estudio de la dinámica temporal de los metabolitos en las hojas de la papa [13], así como en hojas de la naranja dulce de Valencia (enverdecimiento de los cítricos o citrus Huanglongbing cuyo propósito fue encontrar diferencias metabolómicas entre hojas que sean saludables, que estén infectadas con HLB y que tengan deficiencia de zinc [14].

La investigación dirigida a la producción de metabolitos secundarios en comparación a la de metabolitos primarios aún no ha sido ampliamente abarcada. Sin embargo, se conoce que los metabolitos secundarios son generados por diferentes rutas bioquímicas [15], [12]. Algunos ejemplos de estos compuestos pueden ser: Alcaloides, flavonoides, benzoquinonas, glucósidos, tetraciclinas, cumarinas, aminoazúcares, salicilatos, etc [15].

Con base a lo expuesto, los objetivos del presente trabajo fueron i) Aislar el hongo *Mycosphaerella fijiensis* de diferentes provincias del Ecuador. ii) Evaluar la resistencia de las cepas crecidas de *Mycosphaerella fijiensis* frente a un fungicida a diferentes concentraciones y iii) Determinar los perfiles metabólicos mediante Cromatografía de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas y de esta forma, identificar qué tipos de compuestos están presentes en ambos tipos de cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo in vitro de muestras de *Mycosphaerella Fijiensis*

Treinta aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* procedentes de las provincias del Guayas, El Oro, y Esmeraldas junto con la región Oriental pertenecientes al banco de cepas del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), fueron reactivadas en medio PDA (Potato dextrosa agar) e incubadas de 30 a 45 días a una temperatura de 26 °C en condiciones de total oscuridad [16].

Medios con fungicidas.

Para la elaboración de medios con fungicidas se utilizó protocolos del CIBE a concentraciones de 1 ppm, 10ppm, 100 ppm, 1000 ppm y 10000 ppm de Thiabendazole en medio PDA [17]. Secciones de micelio del hongo fueron colocados en los medios con fungicidas e incubados durante 34 a 38 días hasta el crecimiento del hongo, adicionalmente se realizaron cepas control de cada una de las muestras de las zonas a evaluar [18].

Análisis Metabólicos

Las condiciones técnicas del cromatógrafo (Agilent Technologies) se detallan a continuación: Temperatura de inyección 240 C, Temperatura de interface a 200 C, temperatura de estufa a 70 C por 1 minuto, 7 C/min, 310 C por 5 min, columna HP5 de 30 metros y de 0.5 um de diámetro y MS en modo total scan con rango de detección m/z 50 a 650.

Para la obtención de metabolitos se emplearon protocolos de Cevallos 2012 [19] que consistió en que pequeños cortes de las muestras de *Mycosphaerella fijiensis* crecidas en medios con fungicidas junto con el control se pesaron y se les agregó 1.5 ml de la solución de metanol-cloroformo-agua en concentración (8:1:1) para cada uno de los tubos que contenían las muestras. Se dejó reposar por 48 horas a 7 °C previas a su uso. Se centrifugaron a 15000 rpm por 4 minutos y se transfirieron 600 microlitros del sobrenadante a nuevos tubos respectivamente. Estos tubos se llevaron a baño maría a 80 °C durante 1 hora y media hasta que la muestra se haya secado. Para el proceso de derivatización se agregó 150 microlitros del reactivo N-methyl-Nt-butyl-dimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA Thermo Scientific) en cada uno de los tubos y se colocó en baño maría durante 1 hora y media, finalmente las muestras se analizaron en el cromatógrafo.

Análisis de resultados

Los datos obtenidos del sistema 7890A/5975C GC/MS (Agilent Technologies), fueron alineados utilizando el software Mz mine versión 2.8 [20] para análisis de espectrometría de masas, el alineamiento se realizó mediante la detección de masas y la construcción de perfiles cromatográficos para cada una de las muestras de las provincias seleccionadas del estudio. Posteriormente, se realizaron los análisis estadísticos multivariados en el que se determinó las relaciones entre niveles de resistencia mediante análisis de componentes principales (ACP) [21] con la ayuda de un programa estadístico XLSTAT versión 2015.

RESULTADOS

De las cepas sembradas en medio PDA con Thiabendazol, se logró distinguir cuales de ellas mostraron resistencia y susceptibilidad (Ver tabla 1 y 2 respectivamente). En las figuras 1 y 2 se muestran las principales cepas resistentes de las provincias del Guayas y El Oro.

TABLA 1- Cepas resistentes de diferentes provincias/región

Provincia/ región	Cepas resistentes	Concentraciones con Thiabendazol					
		PDA control	1 PPM	10 PPM	100 PPM	1000 PPM	10000 PPM
ESMERALDAS	ECU12	x	x	x	x		
GUAYAS	GNA14	x	x	x	x		
GUAYAS	GNM1	x	x	x	x	x	
GUAYAS	GS 89	x	x	x	x	x	
GUAYAS	GSA 16	x	x	x	x	x	
GUAYAS	GSN84	x	x	x	x	x	
GUAYAS	GSA1	x	x	x	x	x	
EL ORO	OCM 37	x	x	x	x		
EL ORO	OSSR 151	x	x	x	x		
EL ORO	OSA 23	x	x	x	x		
EL ORO	OSSR 100	x	x	x	x		
EL ORO	OSSR 84	x	x	x	x	x	
EL ORO	OSA 6	x	x	x	x	x	
ORIENTE	MOSG33	x	x	x	x		
ORIENTE	MOSL24	x	x	x	x		

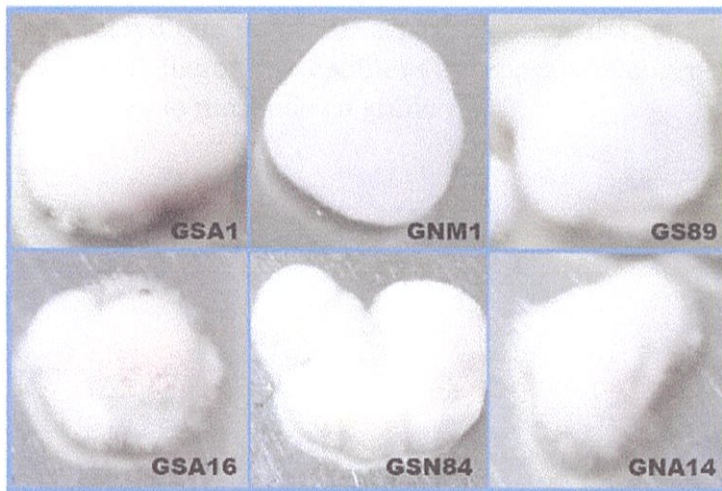


FIGURA 1. Cepas resistentes de la zona del Guayas

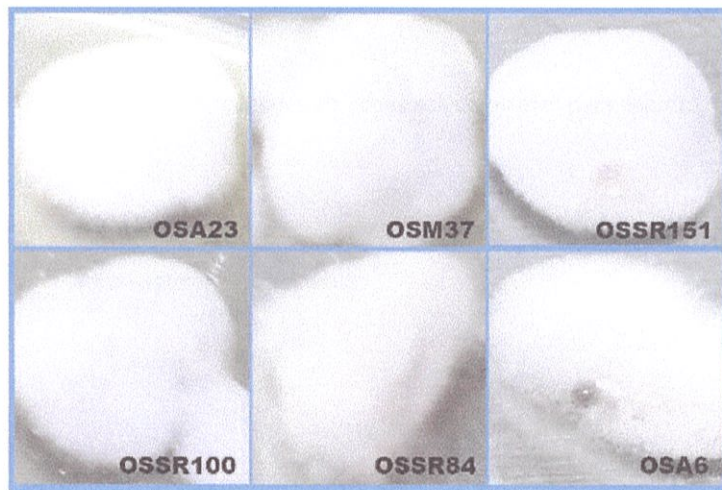


FIGURA 2. Cepas resistentes de la zona de El Oro

TABLA 2 - Cepas susceptibles de diferentes provincias/región

Provincia/Región	Cepas Susceptibles	Concentraciones con Thiabendazol					
		PDA control	1 PPM	10 PPM	100 PPM	1000 PPM	10000 PPM
ESMERALDAS	ENV1	x	x				
ESMERALDAS	EN1	x	x				
ESMERALDAS	EN3	x	x				
ESMERALDAS	ENB25	x	x				
GUAYAS	GNA 12	x	x	x			
GUAYAS	GNM5	x	x	x			
GUAYAS	G54	x	x	x			
EL ORO	ONM41	x	x				
EL ORO	OSA 26	x	x	x			
EL ORO	OSSR 95	x	x	x			
EL ORO	ONS51	x	x	x			
ORIENTE	MOSL50	x	x	x			
ORIENTE	MOSL67	x	x	x			
ORIENTE	MOSL52	x	x	x			
ORIENTE	MOSG26	x	x	x			

De estos resultados, se observó que de las 30 cepas seleccionadas, el 53 % de ellas fueron resistentes (16 cepas) y el 47% fueron susceptibles (14 cepas) a nivel general (Ver gráfico 1); aunque por provincia se obtuvo lo mostrado en gráfico 2.

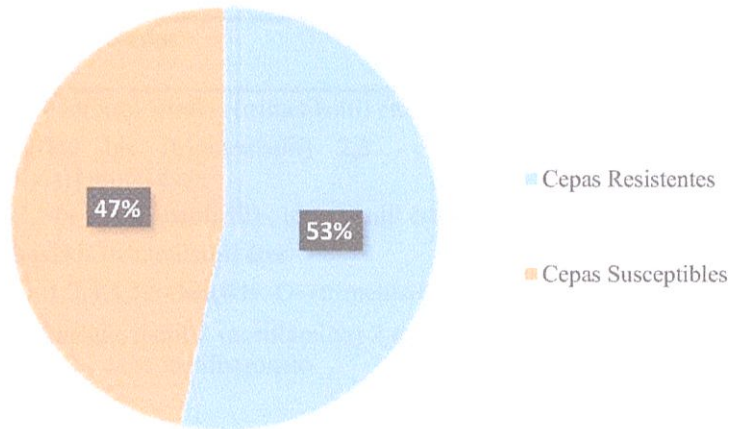


GRÁFICO 1 - Porcentajes de cepas seleccionadas para estudio

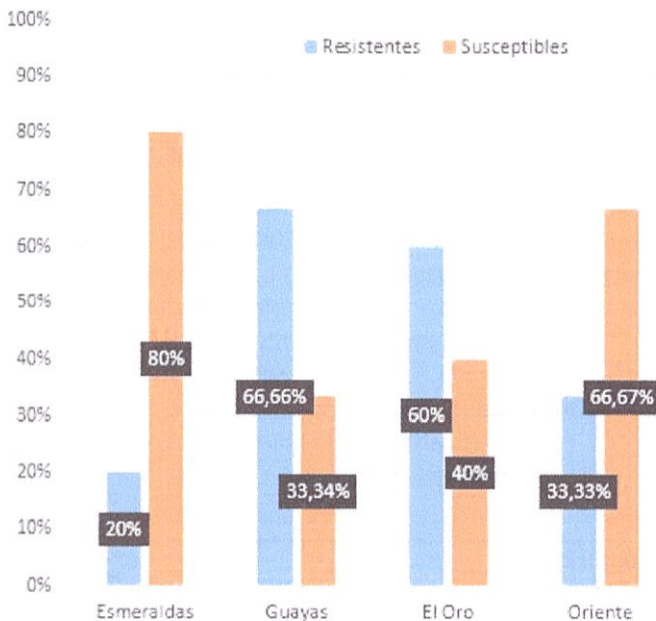


GRÁFICO 2 - Porcentajes de cepas resistentes y susceptibles pertenecientes a cada una de las zonas geográficas seleccionadas

Considerando que el término *resistente* se le atribuye a aquellas muestras que presentaron crecimiento en concentraciones posteriores a los 100 PPM. De acuerdo a esta información, se resaltó que las provincias con mayor resistencia fueron Guayas y El Oro, y mayor susceptibilidad fueron Esmeraldas y la región Oriental.

Para la identificación de los compuestos químicos se empleó tabla de cargas factoriales, seleccionándolos por los tiempos promedios de acuerdo a su valor máximo factorial de tipo 1 o 2 (Ver tabla 3).

TABLA 3 - Compuestos encontrados de las cepas que mostraron los 10 valores más altos de F1 o F2 con su respectivo código NIST.

El Oro^{F2}			
Tiempo Promedio	Compuestos encontrados	Concentración con Th.	Código NIST
22,634	1,5-Anhidro D-sorbitol tetrakis (trimetilsilil) éter	100 PPM	380138
24,198	Ácido fosfórico bis (triometilsilil) 2,3 - bis [(trimetilsilil)oxi] propil éster	100 PPM	79108
22,968	l- Lisina, N2,N6- bis (trimetilsilil)-, trimetilsilil éster	100 PPM	333252
27,544	D-Sorbitol,hexakis (trimetilsilil) éter	1 PPM	380145
28,109	Mio- Inositol, 1,2,3,4,5,6- hexakis -O- (trimetilsilil)-	PDA CONTROL	380339
23,023	α -D-Glucopiranosida, metil 2-(acetilamino)-2-deoxi-3-O-(trimetilsilil)-, ciclo metilboronato	100 PPM	-
22,307	Isochiapin B	10 PPM	-
25,964	D-Ribo-Hexitol, 3-deoxi-1,2,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	10 PPM	28811
27,422	n-ácido Pentadecanoico, trimetilsilil éster	100 PPM	352555
22.916	Lactulosa, octakis(trimetilsilil) éter (isómero 1)	10000 PPM	380078
Oriente^{F2}			
Tiempo Promedio	Compuestos encontrados	Concentración con Th.	Código NIST
32,952	Ácido Oléico, trimetilsilil éster	10 PPM	30824
32,997	11 -cis-ácido Octadecenoico, trimetilsilil éster	100 PPM	333602
32,402	Pentatriacontano	10000 PPM	233161
33,754	HAHNFETT	10 PPM	-
33,138	11-trans-ácido Octadecenoico, trimetilsilil éster	10 PPM	333560
11,521	Metil 7-(2,4,6-trimetilfenil)-5H-furo[2,3-c]]tiopiran-4-carboxilato	PDA CONTROL	-
33,861	Bis[2-(3,4-dihidroxi-4-bromofenil)-1-cianoetenil]sulfonato	100 PPM	-
33,859	β -d-Fructopiranosida, 1-deoxi-1-(4-morfolinil)-2,3,4,5-tetrakis-O-(trimetilsilil)-	1000 PPM	149435
26,875	β -D-Allopiranosida, pentakis(trimetilsilil) éter	10 PPM	-
26,616	GLUCOSA 5TMS	1000 PPM	-
Esmeraldas^{F1}			
Tiempo Promedio	Compuestos encontrados	Concentración con Th.	Código NIST
36,459	1-[4-(trimetilsiloxi)fenil]-3-[2,4-di(trimetilsiloxi)fenil]-2-propen-1-uno	1 PPM	360393
37,248	Aceite SILICONA	PDA CONTROL	-
36,496	Dotriacontano	10 PPM	228956
36,492	HAHNFETT	PDA CONTROL	-
36,451	12-(tert-Butildimetilsilil)oxi]-4b-(etoxicarbonil)-1,2,3,4,4a,4b,7,8,9,10,10b,11-dodecahidro-5H-benzo[b]nafto[2,1-d]piran-5-uno	PDA CONTROL	-
35,058	5-Alil-2,3-bis(metoxicarbonil)-4,4-difenil-6-(p-tolil)-1-aza-4.lambda.(5)-fosfinina	10 PPM	-

35,344	Glicerina-1,3-dimiristato, 2-O-trimetilsilil-	10 PPM	155960
35,615	7-Methoximetil-1-(trimetilsilil)-1-[1,1-bis(trimetilsilil)etil]-2-oxa-1-silaindano	100 PPM	-
35,101	Ciclodecasiloaxano, eicosametil-	PDA CONTROL	161274
35,114	Manitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-(trimetilsilil)-, bis(trimetilsilil) fosfato, D-	1 PPM	18729

El Guayas^{F2}

Tiempo Promedio	Compuestos encontrados	Concentración con Th.	Código NIST
27,533	D-Sorbitol, hexakis(trimetilsilil) éter	100 PPM	380145
27,537	D-Manitol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimetilsilil)-	PDA CONTROL	380338
25,608	D-Ribo-Hexitol, 3-deoxy-1,2,4,5,6-pentakis-O-(trimetilsilil)-	1 PPM	28811
27,596	Trimetilsilil éter de glucitol	1 PPM	158663
24,996	2-Keto-1-ácido glucónico, penta(O-trimetilsilil)-	10000 PPM	59824
27,508	α -D-(+)-Talopiranosas, pentakis(trimetilsilil) éter	100 PPM	-
27,774	(R)-2-Tosiloxi-1-(p-metoxifenil)etanol	10000 PPM	-
12,672	Metil 7-(2,4,6-trimetilfenil)-5H-furo[2,3-c]tiopiran-4-carboxilato	1000 PPM	-
24,372	D-Erythro-Pentofuranosa, 2-deoxy-1,3,5-tris-O-(trimetilsilil)-	1000 PPM	-
23,915	ácido fosfórico, bis(trimetilsilil) 2,3-bis[(trimetilsilil)oxi]propil éster	1000 PPM	79108

De manera general, los compuestos químicos encontrados de las muestras seleccionadas pertenecen a distintos tipos como: carbohidratos (polialcoholes, monosacáridos, polisacáridos, grupos piranosas), alcanos, hidruros, ácidos grasos, alcoholes y compuestos orgánicos de silicio. De estos, los carbohidratos se encontraron en mayor proporción.

Otra observación fue la identificación de grupos químicos diferentes entre muestras del mismo tipo pero que fueron sembradas a distintas concentraciones con Thiabendazole, el cual podría deberse a cambios de estrés sometidos lo que derivó variaciones en su respuesta metabólica como mecanismo de defensa.

Posterior al alineamiento y normalización de los datos, se desarrolló la técnica de Análisis de Componentes Principales (ACP), para comparar los perfiles metabólicos por cada grupo de provincia. En el cual se obtuvieron las observaciones y figuras de Biplot basándose en los valores factoriales de F1 y F2 para las distintas zonas (Ver figuras 3, 4, 5 y 6).

En las observaciones, se mostró que en todas las zonas existe una aparente homología en sus perfiles metabólicos. Añadido a esto, la tendencia de crecimiento de los datos en ellas sirvió como base para detectar el tipo de valor factorial por cada provincia, siendo así: Esmeraldas (F1), El Oro (F2), Oriente (F2) y Guayas (F2).

En la figura 7 de Biplot, se observó que los valores más altos de F2 y F1 lo mostraron Guayas (entre 0.981 y 0.984) y Esmeraldas (0.987 y 0.989) respectivamente, estos valores se deben a un mayor número de compuestos. Adicionalmente, algunos que mostraron mayor abundancia por provincia fueron: Esmeraldas: aceite silicona, Dotriacontano, D-Manitol; Guayas: D-

Sorbitol, D-Manitol, D-Ribo-Hexitol; Oriente: Ácido Oleico, Pentatriacontano; El Oro: D-Sorbitol, Ácido fosfórico.

A continuación se muestran observaciones (F1 y F2) para cada una de las zonas geográficas, indicando las muestras con sus concentraciones, A: 1 PPM; B: 10 PPM; C: PDA control; D: 100 PPM; E: 1000 PPM; F: 10000 PPM.

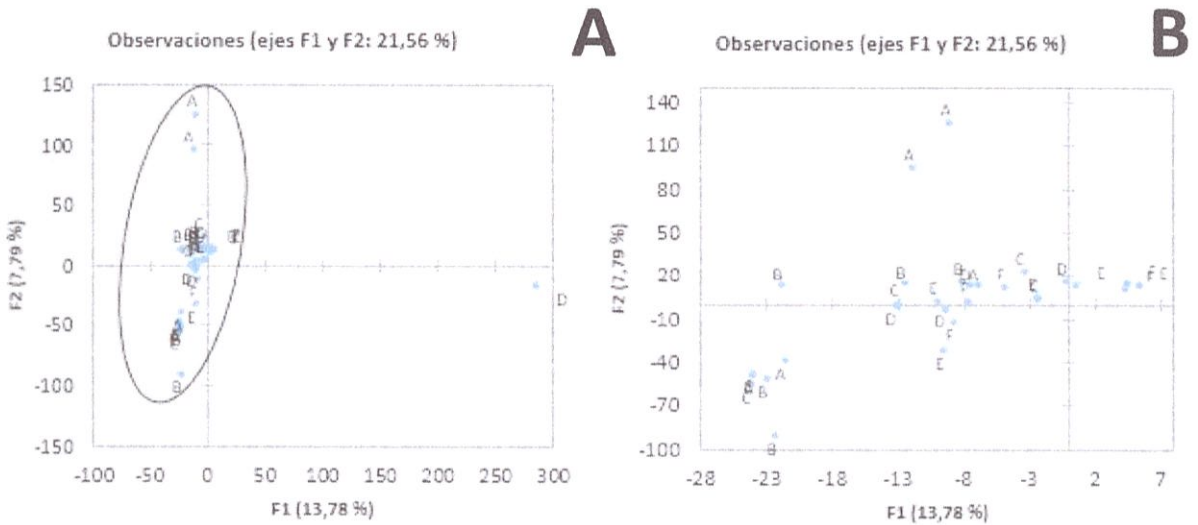


FIGURA 3 - Observaciones de la provincia de Esmeraldas mediante ACP. A: Imagen general de todas las muestras con sus concentraciones. B: Imagen ampliada de la figura 3A

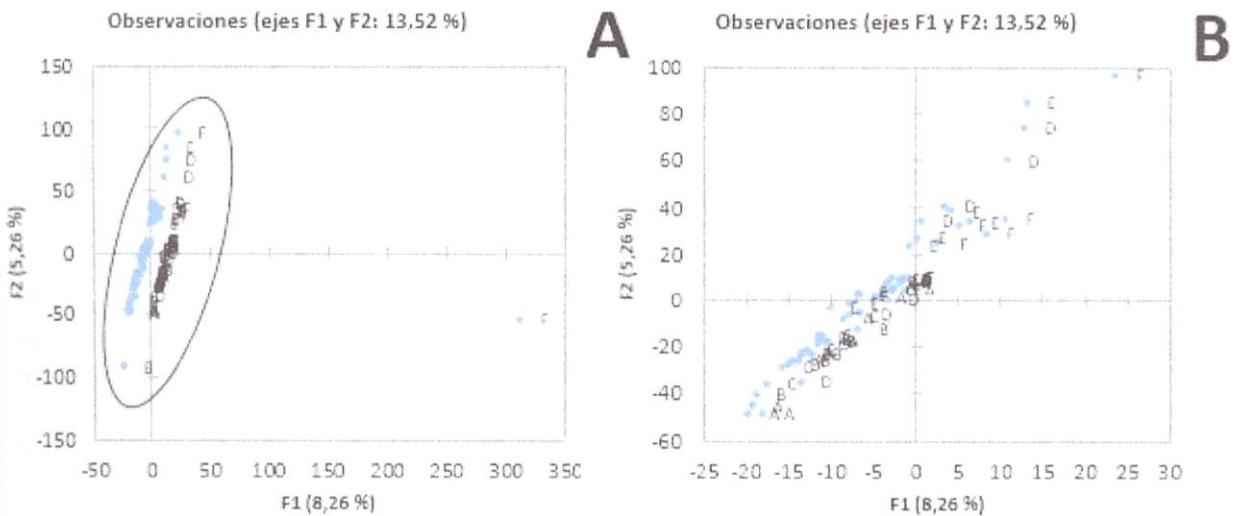


FIGURA 4 - Observaciones de la provincia de El Oro mediante ACP. Imagen general de todas las muestras con sus concentraciones. B: Imagen ampliada de la figura 4A

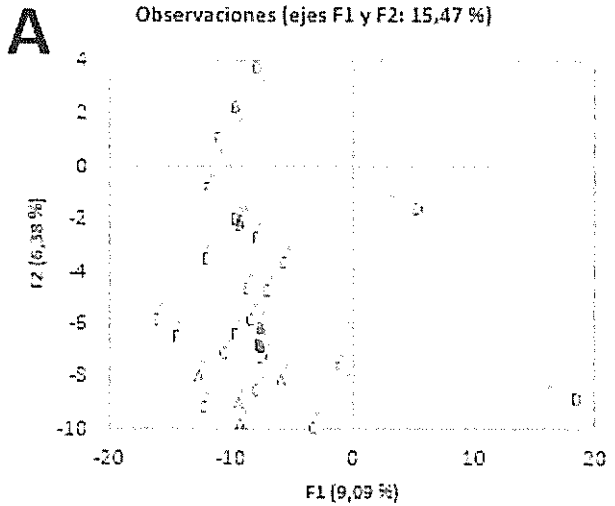
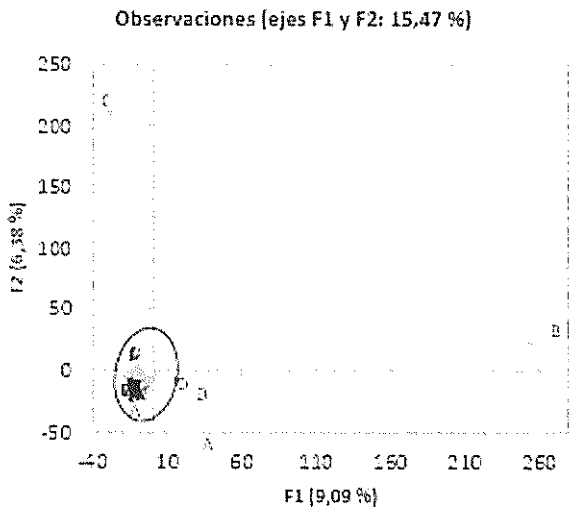


FIGURA 5 - Observaciones de la región Oriente mediante ACP. A: Imagen general de todas las muestras con sus concentraciones. B: Imagen ampliada de la figura 5A

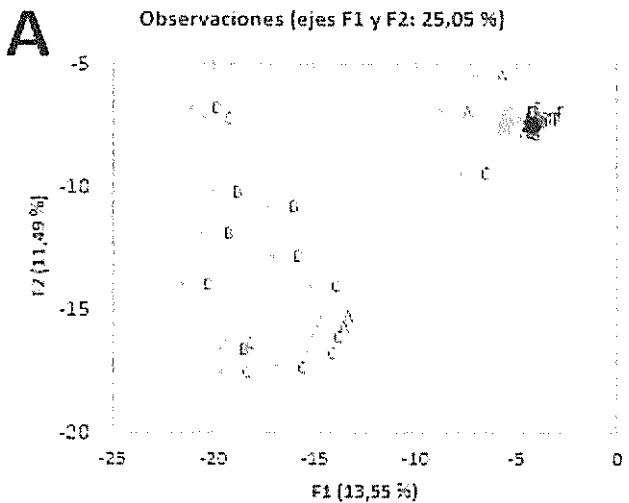
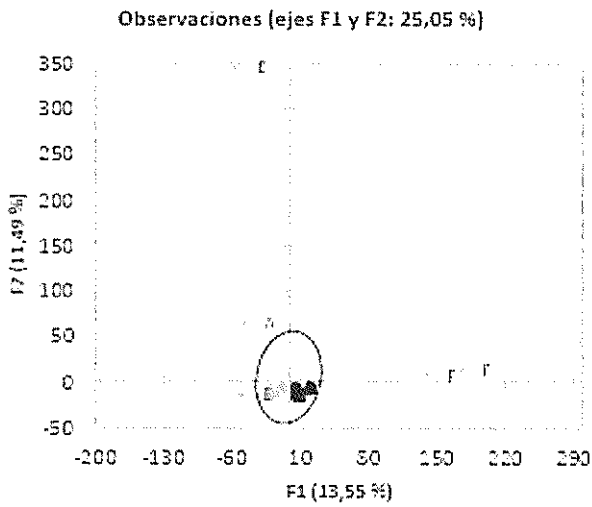


FIGURA 6 - Observaciones de la provincia del Guayas mediante ACP. A: Imagen general de todas las muestras con sus concentraciones. B: Imagen ampliada de la figura 6^a

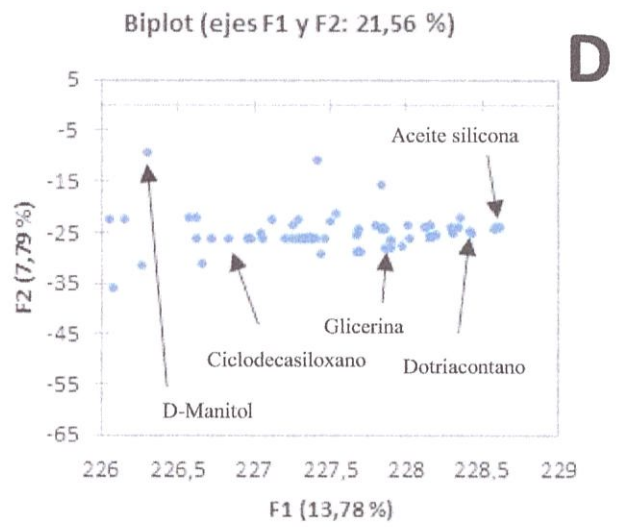
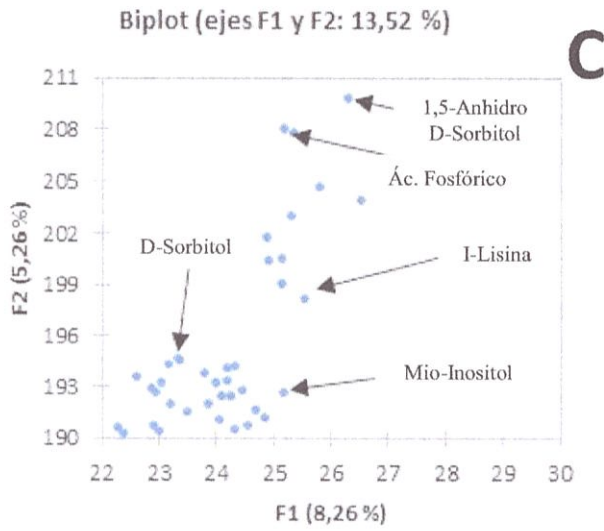
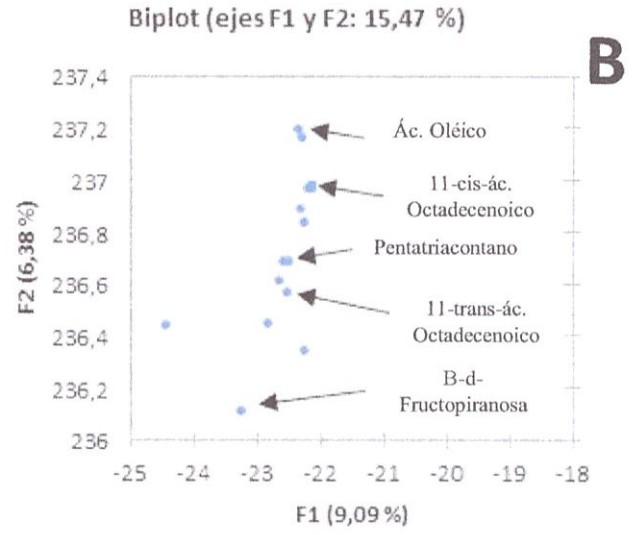
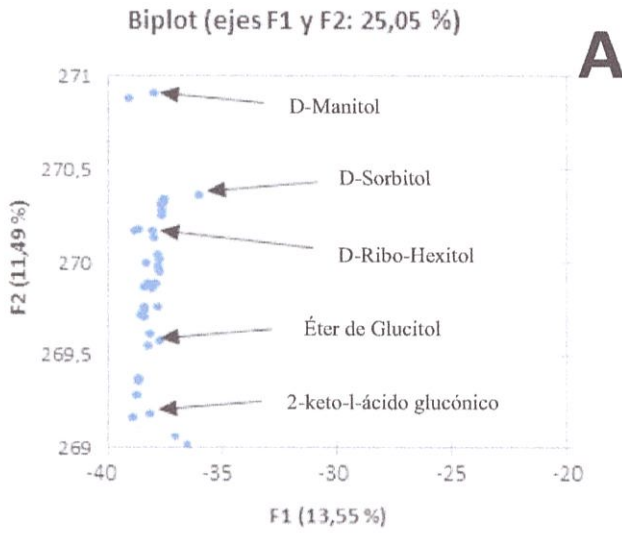


FIGURA 7 - Biplots de los 20 compuestos con factoriales F1/F2 más altas (Tabla 3) presentes en las 4 zonas de estudio. A: Metabolitos con valores F2 más altos pertenecientes al Guayas. B: Metabolitos con valores F2 más altos pertenecientes al Oriente. C: Metabolitos con valores F2 más altos pertenecientes a El Oro. D: Metabolitos con valores F1 más altos pertenecientes a Esmeraldas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las 30 muestras seleccionadas para este estudio, determinaron que el 53 % de ellas llegaron a ser resistente y el 47 % susceptible, a pesar que el thiabendazol (benzimidazol) es considerado como uno de los fungicidas por medio del cual el hongo *Mycospaherella fijiensis* ha perdido sensibilidad desde hace algunos años [22], [23].

Las muestras provenientes del Guayas y El Oro mostraron mayor cantidad de cepas resistentes, esto podría deberse a que las condiciones óptimas del suelo junto a las condiciones climáticas como la temperatura (entre 23 a 27 °C) que presentan estas regiones favorecen al cultivo del banano y a su vez, al desarrollo del hongo *Mycosphaerella fijiensis* [24]. Factores como el clima (tropical - húmedo) [25], el suelo (alta fertilidad- buenas propiedades de retención de agua), pH ideal, temperatura, pluviosidad y la topografía de cada provincia/región, influyen en la dispersión de la enfermedad en el cultivo.

Las principales zonas de producción de banano y las áreas cultivadas según MAGAP [26] son las provincias de El Oro y Guayas, por lo que aplican una mayor cantidad de fungicidas para el control de la Sigatoka con el fin de evitar pérdidas económicas. De estas provincias, se obtuvo una mayor cantidad de cepas resistentes lo que puede estar influenciado a una mala rotación de productos y a un inadecuado manejo técnico que en conjunto con la humedad y el calor, el hongo se esparce rápidamente de manera que evitan el control del mismo [26].

El comportamiento y agresividad de la enfermedad ha estado relacionada básicamente con la cantidad y distribución de las lluvias. Esta es la razón por la cual la Sigatoka negra es de elevada incidencia durante la época lluviosa. Según monitoreos realizados por la FRAC (Fungicide Resistance Action Committee [1]) en Ecuador para analizar comportamiento de resistencia a la sigatoka, los resultados indicaron que haciendo un control preventivo de la enfermedad, es decir, aplicando fungicidas sistemáticos antes de que comiencen la lluvias, se ha logrado que estos funcionen con todo su potencial biológico en la época lluviosa; situación que no ocurre cuando se espera que aparezcan síntomas severos con lesiones en las hojas y recién allí se decida a aplicarlos. Esto ha permitido, reducir año tras año el número de ciclos aplicados y consecuentemente los costos de control; así como también preservar el medio ambiente.

La aplicación de fungicida según la dosis cambia dependiendo de varios factores como: formulación del producto, enfermedades, cultivo, clima. En el caso del Thiabendazole se puede aplicar de 150 a 300 g/l 00 litros de agua o 500 g/ha. lo que hace del grupo de los benzimidazoles adquiera resistencia debido a las múltiples aplicaciones de fungicidas; y esto, se fundamenta básicamente en los mecanismos más importantes desarrollados por los mismos individuos resistentes, que dan conocer que el acople (fungicida + hongo) no ocurra, los cuales son: la presencia de menor permeabilidad de las membranas celulares, rutas metabólicas alternas, detoxificación del fungicida, falta de activación del fungicida por el patógeno y la alteración del sitio reactivo [27].

Una combinación limitada de ciclos de aplicación, alternancia y uso de mezclas permitirá usar todas las herramientas disponibles para el manejo de resistencia, lo que nos asegura un control eficiente de la sigatoka negra, lo cual no ocurrió con las 2 provincias mencionadas. La resistencia a los benzimidazoles se encuentra totalmente dispersa a niveles altos y la eficacia en el campo se ve afecta en todas las regiones bananeras.

La aplicación de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) junto a la herramienta estadística ACP permitió un análisis bioquímico que presentan estas cepas ante diversas condiciones de estrés mediante la identificación de sus metabolitos (Ver figuras 3, 4, 5 y 6). Tomando como referencia la (Tabla 3), en donde se nombra los 10 compuestos químicos con los valores más altos de F1 y F2 según el origen de la muestra, se resaltan sustancias como D-Manitol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(trimetilsilil)-, D-Sorbitol, hexakis(trimetilsilil) éter, D-Eritro-Pentofuranosa, 2-deoxy-1,3,5-tris-O-(trimetilsilil)-, D-Ribo-Hexitol, 3-deoxy-1,2,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)- , entre otros cuya presencia indicaría el gasto metabólico de fuentes de reserva como azúcares (manosa, glucosa, eritrosa) producido en estos hongos como mecanismo de defensa, que comparados con otras investigaciones como es el caso de estudio acerca del enverdecimiento cítrico de la naranja dulce “Valencia” [14] permite entender que, ante la poca disponibilidad de nutrientes en el medio a condiciones de estrés más altos son potencialmente efectivos para el aumentar el desgaste bioquímico del hongo causado por la asimilación de sus sustancias de reserva, que conllevan a la síntesis de metabolitos, y que podrían influir directamente en su crecimiento.

CONCLUSIONES

En esta primera fase de investigación, se pudieron obtener una lista importante de los metabolitos producidos por el hongo como respuesta a la acción de los fungicidas, todos estos compuestos serán analizados en la segunda fase del proyecto para determinar las diferentes rutas metabólicas que se producen en las cepas del hongo. Esta información base servirá como referente para entender el comportamiento del patógeno e implementar mecanismos de control orientados a su metabolismo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo constituye la primera fase del Proyecto de Investigación “Estudio de perfiles metabolómicos de cepas de *Mycosphaerella fijiensis* resistentes a fungicidas mediante Cromatografía de gases”.

Agradecemos principalmente a Dios por darnos unos maravillosos ángeles que son nuestros padres, familia por todo el apoyo que nos han brindado. Los autores desean expresar su agradecimiento a sus tutores Msc. Gabriela Maridueña y Ph.D. Juan Manuel Cevallos por sus conocimientos, orientaciones y haber depositado su confianza en nosotros y al Centro de Investigaciones Biotecnológica del Ecuador (CIBE-ESPOL) por hacer uso de sus laboratorios fomentando la investigación y haber culminado la primera parte de este estudio.

REFERENCIAS

- [1] FRAC, "Fungicide Resistance Action Committee," 2014. [En línea]. Available: <http://www.frac.info/>. [Último acceso: 16 Mayo 2015].
- [2] CORPEI, "Banano, Perfiles de Productos," 2007. [En línea]. Available: http://200.110.94.59/productos_down/perfil_de_banano_2005765.pdf. [Último acceso: 16 Mayo 2015].
- [3] FAO, "La Sigatoka negra en plátano y banano," Julio 2013. [En línea]. Available: <http://www.fao.org/docrep/019/as089s/as089s.pdf>.
- [4] G. Manzo, S. Guzmán, C. Rodríguez, A. James y M. Orozco, "Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su Interacción con *Musa* spp.," 2005. [En línea]. Available: http://www.researchgate.net/profile/Gilberto_Manzo-Sanchez2/publication/233401158_La_biologa_de_Mycosphaerella_fijiensis_y_su_interaccion_con_Musa_spp/links/0912f50a3c0415224a000000.pdf. [Último acceso: 16 Mayo 2015].
- [5] M. Orozco, J. Orozco, O. Pérez y G. Manso, "Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos," *Tropical Plant Pathology*, vol. 33, pp. 189-196, 2008.
- [6] M. Zhonghua y J. Themis Michailides, "Los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares de resistencia a fungicidas y la detección molecular de genotipos resistentes en hongos fitopatógenos," *Science Direct - Crop Protection*, vol. 24, p. 853-863, 2005.
- [7] A. Ayala, M. Colina, J. Vargas, L. Rosales y H. Cárdenas, "Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet que produce la Sigatoka negra que ataca el plátano.," *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. XV, nº 6, pp. 312-338, Diciembre 2014.
- [8] L. Davidse y W. Flach, "Interacción de tiabendazol con la tubulina fúngica," *Biochim. Biophys. Acta* 543, pp. 82-90, 1978.
- [9] L. Pérez-Vicente, "Manual on Fungicides and Fungicide resistance monitoring in banana.," *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, pp. 5-6, 2013.
- [10] S.-A. Fancy y K. Rumpel, "Metabolómica basada en GC-MS," *Methods in Pharmacology and Toxicology*, pp. 317-340, 2008.
- [11] M. Gutiérrez y M. Droguet, "La Cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor.," *Boletín Intexter (U.P.C.)*, nº 122, pp. 35-41, 2002.

- [12] A. Cortez-Sánchez y T. Mosqueda-Olivares, "Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico," *Química Viva*, 2013.
- [13] Y. Abu-Nada , A. Kushalappa, W. Marshall , K. Al-Mughrabi y A. Murphy , "Temporal dynamics of pathogenesis-related metabolites and their plausible pathways of induction in potato leaves following inoculation with *Phytophthora infestans*," *Eur J Plant Pathol* 118, p. 375– 391., 2007.
- [14] J. M. Cevallos-Cevallos, R. García-Torres, E. Etxeberria y J. I. Reyes-De-Corcuera, "GC-MS análisis de espacio de cabeza y extractos líquidos de Metabolómica Diferenciación de cítricos Huanglongbing y Deficiencia de Zinc en hojas de 'Valencia' Sweet Orange Groves Comerciales," *Phytochemical Analysis. Published online in Wiley Online Library*, nº 22, pp. 236-246, Noviembre 2010.
- [15] A. Demain, "Metabolismo fúngico secundaria: regulación y funciones," *In: Sutton B (ed) A century of mycology*, pp. 3-254, 1996.
- [16] D. Intriago, "Identificación y evaluación en laboratorio e invernadero de microorganismos antagonistas de *Sigatoka negra* (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en musáceas en el Litoral ecuatoriano.," Manabí, 2009.
- [17] T. Olsen y R. Fullerton , "La variabilidad patogénica en *Mycosphaerella fijiensis* Morelet," *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, vol. 23, pp. 39-48, 2010.
- [18] M. Barcos, "Determinación de la influencia de calcio, cobre y boro en el desarrollo de plantas micropropagadas de banano variedad Williams, e inoculadas con conidias y concentrado crudo tóxico de *Mycosphaerella fijiensis*," Guayaquil, 2009.
- [19] J. Cevallos-Cevallos, T. D.B. Futch, S. Shilts, Folimonova y J. Reyes de Corcuera , "GC-MS Diferenciación metabólica de variedades de cítricos seleccionados con diferente sensibilidad a Huanglongbing de los cítricos.," *Plant Physiology and Biochemistry*, pp. 69-76, 2012.
- [20] M. Katajamaa, J. Miettinen y M. Oresic, Manual de MZmine 2.8, MZmine Development Team, 2006.
- [21] J. Cevallos, J. Reyes, E. Etxeberria, M. Danyluka y G. Rodrick, "Análisis Metabólica en ciencias de la alimentación: una revisión," *Trends in Food Science and Technology* 20, nº 20, pp. 558-560, 2009.
- [22] R. Fullerton y G. Tracey, "Tolerancia de *Mycosphaerella fijiensis* a benomil y carbendazim en las islas del Pacífico.," *Tropical Agriculture*, pp. 133-136, 1984.
- [23] R. Romero y T. Sutton, "Sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la *Sigatoka negra*," *Phytopathology* 87, pp. 96-100, 1997.

- [24] Inibap, "Actas del taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos," Guayaquil, 2003.
- [25] O. Ruiz, M. Jiménez, E. Santos y E. Peralta, "Estimación Bayesiana en la relación Clima-Sigatoka negra," *Revista Tecnológica ESPOL*, 2009.
- [26] R. Sánchez, J. Pino , C. Vallin , M. Pérez y Y. Iznaga, "Efecto del Fungicida Natural F20 contra la enfermedad Sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plátano (AAB) y banano (AAA).," *Infomusa*, vol. 1, n° 22, pp. 14-16, 2002.
- [27] A. Fernández Holguín, *El Banano en Ecuador. Cultivo de plagas y enfermedades*, Guayaquil: CSC, 1984.