

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas,
Oceanográficas y Recursos Naturales**

“Análisis Genético de la Resistencia a Triazoles en
Aislados de *Mycosphaerella fijiensis* para Poblaciones de
Ecuador.”

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del Título de:

BIÓLOGA

Presentada por:

Tatiana Paola Chávez Navarrete

GUAYAQUIL – ECUADOR

2012

Agradecimiento

A mi hermosa familia, mi hermana Karla Chávez, mi Padre, mis hermanos, a todo el personal del CIBE-ESPOL, de manera especial a mi Director de tesis Pablo Chong Aguirre, Dra. Esther Peralta y mis amigos y gran apoyo; Liliana Villao, Christian Romero, Eduardo Sánchez y Lisette Hidalgo.

Dedicatoria

A mi madre: mi amiga, mi fuerza, mi meta

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

M. SC. Jerry Landivar
DECANO DE LA FIMCBOR
PRESIDENTE

M. SC. Pablo Chong
DIRECTOR DE TESIS

M. SC. Marco Álvarez
CODIRECTOR DE TESIS

M. SC. Francisca Burgos
VOCAL PRINCIPAL

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).

Tatiana Paola Chávez Navarrete

RESUMEN

La enfermedad de la Sigatoka Negra genera grandes pérdidas para el sector bananero en Ecuador. Esta enfermedad es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*. El sistema de control convencional, para Ecuador determinado por el uso de fórmulas químicas, de la enfermedad podría estar relacionado con cambios moleculares específicos ya descritos en genes asociados a la resistencia hacia la acción fungicida. En el siguiente estudio se analizó la relación entre la variación genética de las poblaciones de Ecuador con la presión ejercida por el control convencional. Se realizó un análisis de la sensibilidad *in vitro* hacia dos tipos de fungicidas del grupo de los Triazoles (Epoconazol y Propiconazol) en conjunto con una caracterización genética en 60 aislados de *M fijiensis* de diferentes poblaciones del Ecuador y aislados seleccionados como cepas referencia, a fin de comprender la diversidad existente entre cada genotipo, dentro y entre poblaciones y si existe alguna relación con el control convencional. Las muestras fueron tomadas de las provincias del Guayas, Los Ríos y El Oro, principales zonas de producción bananera del País. Se tomaron algunos

aislados de la provincia de Esmeraldas como control, al ser el sitio de entrada de la enfermedad y una región con un tipo de producción menos intensiva, con pocas aplicaciones de control convencional (caso de estudio Triazoles). Para la caracterización se utilizaron 30 marcadores microsatélites. Un número de 23 aislados fueron seleccionados para la secuenciación del gen *CYP51*, debido al polimorfismo encontrado en este gen en cepas tolerantes, se lo ha propuesto como relacionado con la resistencia a fungicidas Triazoles.

Donde se obtuvieron aislados con altos índices de LC-50 ($\geq 20\text{mg/L}$) en la población del Ecuador para los fungicidas químicos estudiados. En la poblaciones de Ecuador se encontró una alta diversidad genética con valores de $h = 0.4202$ (diversidad genética de Nei's 1973), Índice de Shannon = 0.7766 y G_{st} de 0.2465, con una distancia genética baja entre las poblaciones del Guayas y El Oro de 0.12. En los análisis de las secuencias de aislados seleccionados en base a su sensibilidad hacia los fungicidas Triazoles se encontraron mutaciones en el gen *CYP51* en las posiciones correspondientes de la proteína codificada G313A, D461Y, H463Y, N463Y y S463Y del Lanosterol 14 α desmetilasa.

Índice General

RESUMEN.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XV
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES DEL HONGO <i>Mycosphaerella fijiensis</i>.....	6
1.1. Biología de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>.....	7
1.1. Impacto del patógeno sobre los cultivos de Banano y Plátano	8
1.2. Métodos de control del patógeno	10
1.3. Modo de acción de los controles químicos	10
1.4. Modo de acción de los controles orgánicos.....	13
1.5. Mecanismos de Resistencia del patógeno.....	14

CAPÍTULO 2

2. MARCADORES GENETICOS EN EL ANALISIS DE <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	15
2.1. Microsatélites o Short Tandem Repeats (SSRs).....	16
2.2. Minisátelites o Variable number tandem repeat (VNTRs).....	17
2.3. Evolución en las frecuencias alélicas	18
2.3.1. Selección natural	18
2.3.2. Mutación	19

2.3.3. Migración	19
2.3.4. Deriva genética.....	20
2.4. Aplicaciones para la Identificación de Diversidad.....	20

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Zonas de muestreo y número de aplicaciones	21
3.2. Muestreo	23
3.3. Protocolo de Cultivo de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	25
3.3.1. Medios de Cultivo	25
3.4. Protocolos de Pruebas de Sensibilidad	27
3.4.1. Protocolo de obtención de Micelios para el estudio de sensibilidad en placas de microtitulación de 96 pozos.....	27
3.4.2. Soluciones.....	28
3.5. Protocolos de Extracción de ADN	29
3.5.1. Soluciones	29
3.6. Cuantificación de ADN	30
3.7. Secuencia de Iniciadores o Primers.....	31
3.8. Protocolo de PCR.....	34
3.9. Análisis de Datos	36
3.9.1. Análisis de Sensibilidad	36
3.9.2. Análisis de la Caracterización Molecular.....	37
3.9.3. Análisis de Secuenciación.....	38

CAPÍTULO 4

4. Resultados y Discusión	39
4.1. Análisis de Sensibilidad	39
4.2. Análisis de Caracterización Molecular	48

4.3. Análisis de Secuenciación	57
---	-----------

CAPÍTULO 5

5. Conclusiones y Recomendaciones	65
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXOS	69

Índice de Figuras

FIGURA 1 (Estructura Química Dimensional de las moléculas de Epoxiconazole y de Propiconazole)	12
FIGURA 2 (Numeraciones de sus Hojas de una Planta de Banano).....	24
FIGURA 3: (Diagrama obtenido según los resultados de sensibilidad para el fungicida epoxiconazole obtenidos de las poblaciones de Ecuador).	40
FIGURA 4: (Diagrama obtenido según los resultados de sensibilidad para el fungicida propiconazole obtenidos de las poblaciones de Ecuador).....	41
FIGURA 5: (Diagrama de aislados con su respectivo LC-50 en mg/L para Epoxiconazole)	42
FIGURA 6: (Diagrama de aislados con su respectivo LC-50 en mg/L Propiconazole).....	43
FIGURA 7: (Análisis de correspondencia para todos los aislados del Ecuador y las cepas referencia, agrupados de acuerdo a sus características de sensibilidad hacia los compuestos evaluados (Epoxiconazole y Propiconazole)).....	44
FIGURA 8: (análisis de correspondencia para las poblaciones y las cepas referencia).....	46
FIGURA 9 Dendograma Basado en la Distancia Genética Según Nei's, 1972)	55
FIGURA 10 (Árbol Basado en la Secuencia de Nucleótidos que Codifican para Gen de la proteína CYP51).....	56

FIGURA 11 (Mutaciones Encontradas en el gen que codifica para la proteína CYP51) **60**

FIGURA 12 (Árbol Basado en los Aminoácidos que codifican para la Proteína CYP51) **62**

Índice de Tablas

Tabla I (Principales exportadores Mundiales de Banano)	8
Tabla II (Ciclos de Aplicación de Fungicidas)	22
Tabla III (Gel de Agarosa al 1%)	30
Tabla IV (Descripción de Primers).....	31
Tabla V (Protocolo Para Preparación de PCR Mix).....	34
Tabla VI (Protocolo Para Programa PCR)	34
Tabla VII (Análisis de Sensibilidad Para Epoxiconazole)	39
Tabla VIII (Análisis de Sensibilidad Para Para Propiconazole)	39
Tabla IX (Tabla de Comparación de Número de Alelos entre las poblaciones de Ecuador con Cepas Referencia)	48
Tabla X (Frecuencia Alélica Para Todos los Loci)	50

Tabla XI (Resumen Estadístico de la Variación Genética Para Todos los Loci)	51
Tabla XII (Sumario G-Statics y Gene Flow (Flujo Genético) para Todos los loci)	52
Tabla XIII (Distancia e Identidad Genética de Medidas Originales Según Nei's).....	55
Tabla XIV (Mutaciones de Aislados Secuenciados)	58

Índice de Anexos

Anexo A (Descripción de Estadíos de <i>M. fijiensis</i>)	68
Anexo B (Descripción de Aislados)	70
Anexo C (Protocolo de Cultivo de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>).....	75
Anexo D (Información de LC-50 de todos los aislados Estudiados)	77
Anexo E (Fotografía de Crecimiento en Análisis en Propiconazole).....	80
Anexo F (Fotografía de Crecimiento en Análisis de Epoxiconazole)	81
Anexo G (Imágenes de PCR con Primers Microsatélites).....	81
Anexo H (Tablas de Datos Obtenidos de la Medición de Pares de Base de los Fragmentos de ADN Amplificados).....	83
Anexo I (Frecuencia de Todos los loci)	89
Anexo J (Dendograma de Parentesco entrte Todos los Individuos).....	90

INTRODUCCIÓN

El Ecuador figura como el principal exportador mundial de banano según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (1), con una participación en el mercado de alta aceptación que se ha mantenido durante el tiempo. Posee aproximadamente 171.092 hectáreas en cultivos de banano, donde los principales sectores bananeros se encuentran en las provincias de El Oro, Los Ríos y Guayas con un porcentaje de: 25.33% (43.352 hectáreas), 29.47% (50.419 hectáreas) y 26.1% (44.646 hectáreas respectivamente. (2)

Una de las enfermedades fúngicas más importante que afecta a las plantaciones de plátano y banano es la Sigatoka Negra, producida por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* causante de un gran un impacto negativo en la producción y exportación bananera del Ecuador. *Mycosphaerella fijiensis* altera la capacidad fotosintética de la planta reduciendo así el crecimiento y calidad del fruto. (3) *M fijiensis*, presenta dos estados, el estado perfecto de célula ascógena o sexual perteneciente a la

clase Ascomycetae y el estado imperfecto de conidea o asexual perteneciente a la clase Hyphomycetae, por lo que 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, sobre el mismo individuo. 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. 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 cambiantes condiciones ambientales (3).

Generalmente el control de esta enfermedad se la realiza con fungicidas de acción sistémica, dentro de los cuales los grupos más usados de acuerdo a su modo de acción son: Carboxiamidas que inhiben la enzima succinato deshidrogenasa o complejo II (SDHI), fungicidas Strobirulinas o inhibidores de las quinonas externas de la membrana en el complejo III de la mitocondria (QoI), Triazoles que inhiben la Desmetilación del Esterol (DMI) y Amino Morfolinas (acción multisitio) , las cuales actúan dentro del sistema de la planta. El uso excesivo de estos compuestos ha generado que en las

plantaciones de banano y plátano exista una pérdida gradual de la sensibilidad del patógeno hacia estos fungicidas (4), Generando de manera simultánea impactos sociales y ambientales negativos como: contaminación del suelo por filtraciones, consecuente contaminación de las fuentes de agua potable y el deterioro de la salud humana. Datos presentados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), asegura que 355 mil personas mueren cada año intoxicadas por plaguicidas (5).

Es un hecho conocido que las poblaciones de microorganismos adquieren resistencia parcial o total a la mayoría de las sustancias utilizadas después de alcanzar cierto número de ciclos de aplicación en un cierto número de generaciones del patógeno. (6). Debido a que los microorganismos tienen ciclos de vida cortos, el ritmo de generación en tiempo de la nueva progenie es muy alta. Esta estrategia de reproducción implementa ingeniosas formas de defensa contra los posibles peligros a los que se ven sometidas las generaciones futuras de las poblaciones, entre algunas de éstas, está la adaptación a los cambios ambientales por medio de variación en su información genética.

Los hongos miceliales como *Candida albicans* y hongos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* han desarrollado capacidad de resistencia a Triazoles

debido a múltiples cambios genéticos como son: mutaciones puntuales en el Lanosterol 14 α -desmetilasa (*CYP51*), sobreexpresión de la proteína objetivo del fungicida y activación de una ruta metabólica alterna (7). En estudios hechos en *Mycosphaerella graminicola* (especie altamente relacionada con *M. jijiensis*) se encontró que existe una alta relación entre las mutaciones genéticas del gen *CYP51* del hongo con respecto a la alta resistencia encontrada en el campo contra Epoxiconazol (8). Un análisis realizado en aislados de *Mycosphaerella fijiensis* por medio de microsatélites usados como marcadores moleculares demuestra que el gen *CYP51* que codifica para la proteína Lanosterol 14 α desmetilasa posee mutaciones específicas asociadas a la resistencia a Propiconazol (9). Esto sugiere que es posible cuantificar la variación genética por adaptación o resistencia a fungicidas basados en un análisis de marcadores moleculares genéticos (10).

Debido a la gran importancia económica y alimenticia del banano en el País y a nivel mundial, es importante generar un estimado de la relación entre los posibles mecanismos moleculares de resistencias adquiridas por el patógeno con respecto a la pérdida de sensibilidad de los fungicidas usados en campo para su control. Esta investigación propone generar información de la respuesta de sensibilidad del hongo a fungicidas Triazoles correlacionándola con la diversidad genética del organismo basada en la caracterización molecular por marcadores microsatélites. El trabajo estimará

estadísticamente la frecuencia alélica, el flujo de genes, la frecuencia genotípica, el polimorfismo de loci, el Índice de Fijación y la distancia genética para cuantificar el número y frecuencia de los diferentes genotipos de las poblaciones (11).

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES DEL HONGO *Mycosphaerella fijiensis*

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, en estado imperfecto (*Pseudocercospora fijiensis*) es el causante de la necrosis foliar de las hojas de banano por medio de la formación de rayas negruzcas paralelas a las nervaduras de las hojas que con el tiempo cubren grandes extensiones de la hoja afectada. Esta enfermedad es mejor conocida como Sigatoka Negra. La enfermedad degenera en necrosis de las hojas debido a la retención de humedad, reduciendo el área foliar y produciendo el decrecimiento del fruto aproximado en un 50% o más, (12, 13, 14). Debido a que posee una alta tasa de producción de ascosporas, un alto número de ciclos sexuales por año con una gran efectividad de infección en el tejido de la planta, esta enfermedad ataca y predomina con mayor fuerza en las plantaciones del banano en comparación a otras enfermedades (15, 16), volviéndose una de las más importantes.

Fue reportada por primera vez en la isla de Fiji en el año 1963, aunque se estima que se propago por otras zonas del pacífico mucho antes de la fecha reportada debido a indicios registrados en Taiwan (17)

1.1. Biología de *Mycosphaerella fijiensis*

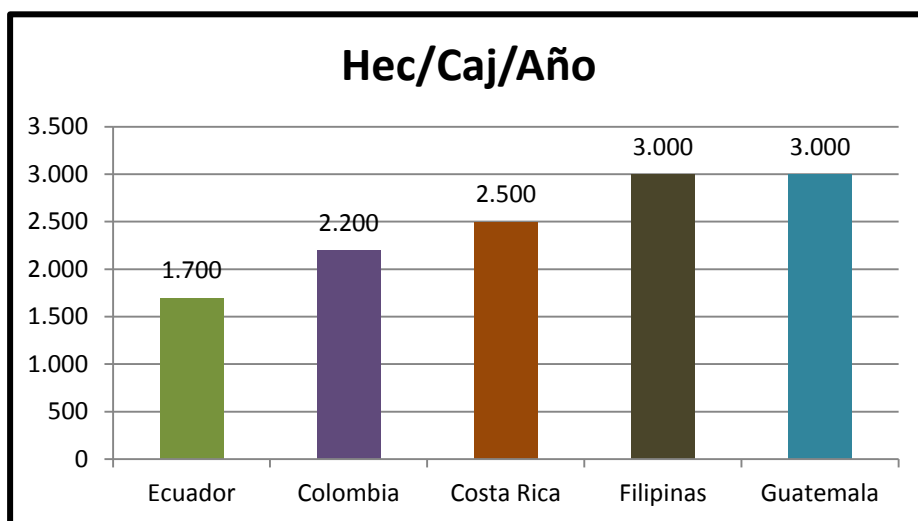
Es un hongo sexual haploide heterotálico ascomiceto, nombrada *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet M.) en la etapa anamorfa (18). Pertenece a la clase *Dothideomycetes*, al orden *Capnodiales* y la familia *Mycosphaerellaceae*. La infección de la planta se compone de cuatro fases principales: germinación de esporas seguida por la penetración al sistema de la planta, lo que da lugar a un proceso sintomatológico en la planta por la infección del patógeno y por último la producción de esporas y generación de conideas que le da la capacidad de resistencia ambiental (vientos, temperaturas, etc) de manera que la infección y virulencia de la enfermedad incrementan (19).

M. fijiensis produce conideos multicelulares en las plantas que son generados y transportados a través de los estomas desarrollándose en el envés de la hoja infectada formando conidióforos (19, 20).

1.2. Impacto del patógeno sobre los cultivos de Banano y Plátano

Dentro del Ecuador el banano se sitúa como el segundo producto más exportado, con un total de 21.493.760 cajas del producto con un peso de 18.14 kilogramos por caja para febrero del 2012, según Asociación de Exportadores Bananeros del Ecuador (AEBE) (21). A nivel mundial el banano es el cuarto alimento más consumido, situado luego del arroz, trigo y maíz, Ecuador es considerado el exportador Bananero con mejor posición de aceptación en el mercado mundial, con un tercio de la exportación mundial de banano. (4). Donde a pesar de ser el mayor exportador, con una alta tasa de aceptación en el mercado de comercio externo, se encuentra ubicado como el quinto país a nivel mundial de producción de banano (21) (Tabla I).

Tabla I
Principales Exportadores Mundiales de Banano



Fuente: Asociación de Exportadores Bananeros del Ecuador (AEBE)

Debido a la alta adaptación que posee el patógeno a influencias ambientales es difícil que exista un ambiente donde la producción de banano o plátano sea exitosa y no lo sea la infección del patógeno (23). Por tal razón la enfermedad es considerada la más devastadora en las plantaciones tanto de banano como de plátano y perjudicial para el progreso económico y ambiental (22, 23).

En 1960 se determinó que *M. fijiensis* era la enfermedad destructiva más eficiente por encima de *M. musicola*, sobre los cultivos de *Musa* variedad Cavendish (genotipo AAA), y puede atacar subgrupos de cultivos de plátano (genotipo AAB), que son relativamente resistentes a la Sigatoka amarilla (13, 24).

Generalmente, en diferentes sistemas de producción tecnificadas, la Sigatoka Negra no produce la muerte de la planta, sino que reduce considerablemente la producción de la fruta de exportación debido a que disminuye la capacidad fotosintética de las hojas de banano, produciendo con esto una maduración prematura del fruto influyendo en su calidad y tamaño.(13)

1.3. Métodos de control del patógeno

1.3.1. Modo de acción de los controles químicos

Para el control de esta enfermedad se han empleado generalmente formulas químicas que reducen el impacto de la enfermedad de tal manera que controlan, en muchos casos tanto el crecimiento del patógeno como su dispersión. Algunos de estos productos se siguen utilizando a gran escala pese a que se ha determinado que el uso de estas formulas incrementa la contaminación ambiental y genera problemas en la salud humana (25, 26), además se ha detectado perdida de sensibilidad en diversos tipos de fungicidas sistémicos, tales como, del grupo de benzimidazoles y del grupo de triazol. No se han podido encontrar formas de control alternativo lo suficientemente eficiente como las moléculas químicas. (27, 15).

Los fungicidas pueden ser agrupados de acuerdo a su modo de acción en tres grupos principales tales como: (i) protectantes, modo de acción de multisitio (ii) de acción local y (iii) sistémica, o denominados también formales que actúan dentro del sistema

celular del hongo, como por ejemplo moléculas de la familia química de los Triazoles que actúan sobre la biosíntesis del ergosterol, (9).

Uno de los controles químicos más usado a nivel mundial para el control de patógenos agrícolas son los de acción sistémica. Los cuales se encuentran clasificados de acuerdo a su modo de acción bioquímica dentro de la biosíntesis del patógeno (4). Los Triazoles se encuentran en la categoría MOA (Modo de acción, por sus siglas en inglés) categoría tipo G: Biosíntesis del esteroles membranales, donde el objetivo es la vía de biosíntesis de la esteroles C14 α -desmetilasa. Pertenecientes al grupo de fungicidas denominados DMI (Inhibidores de la Desmetilación). Según el Comité de Acción a la Resistencia a Fungicidas (FRAC) los DMI se encuentran bajo la categoría de resistencia potencial media. La categoría asignada varía de acuerdo a las fórmulas químicas, modo de acción, estructura tridimensional, entre otras, dentro de cada grupo de fungicida.

Donde a pesar que muchas moléculas pertenecen al mismo grupo de fungicida Triazoles y tienen la misma vía objetivo, debido a su estructura tridimensional poseen diferentes niveles

de resistencia y efectividad para la acción fúngica de control (Figura 1)

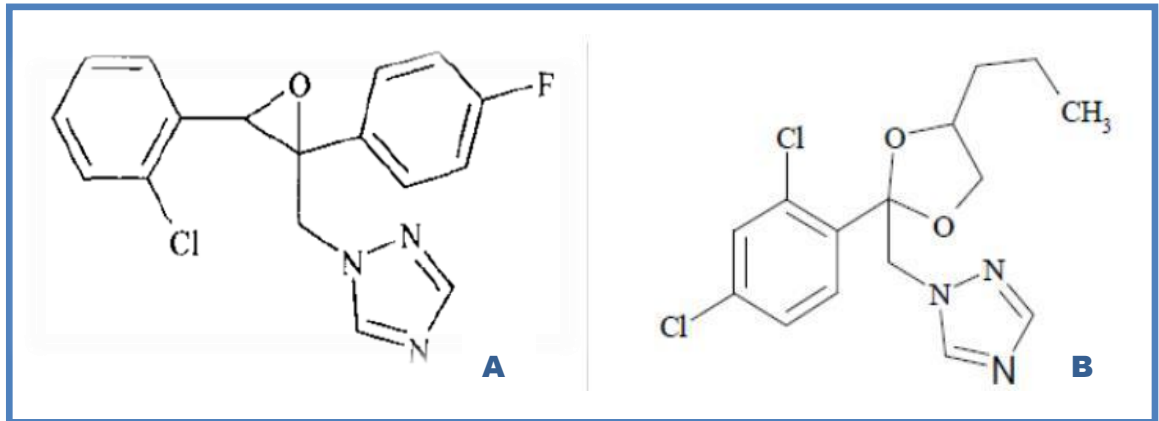


FIGURA 1: Estructura Química Dimensional de Epoxiconazol y Propiconazol

Se observa la estructura química dimensional tanto del fungicida Epoxiconazole (A) (C₁₇H₁₃ClFN₃O) y Propiconazole (B) (C₁₅H₁₇C₂N₃O₂).

Fuente: EPA (Environmental Protection Agency)

1.3.2. Modo de acción de los controles orgánicos

Se estima que el uso de agroquímicos, genera grandes problemas en la salud humana y ambiental en América Latina, donde uno de cada siete trabajadores se intoxica por la aplicación de los mismos en los cultivos agrarios. Se ha demostrado que, la mayor tasa de mortandad por envenenamiento en el mundo, está dado por el uso de plaguicidas inorgánicos. La OMS, estima que dicha mortalidad, es mayor del 1% en algunos países (28).

Debido a los costos económicos y ambientales demostrados, los controles orgánicos han propuesto métodos de prevención de enfermedad, con cuatro principios básicos generales: exclusión, irradiación, protección e inmunización, ya sea manipular el medio ambiente generando condiciones desfavorables para el crecimiento del hongo, control biológico con insectos benéficos, tales como: insectos entomófagos, parasitoides, parásitos o predadores (no determinados aun para *Sigatoka* negra) y control biológico con microorganismos. (29, 30)

1.3.3. Mecanismos de Resistencia del patógeno

Se considera a un organismo como resistente, cuando el uso de un fungicida contra ese patógeno no es lo suficientemente sensible para el control del mismo, generalmente puede existir una acción relacionada hacia otros fungicidas que poseen un método de acción común, o similares formulas químicas o bioquímicas. (31)

Se han determinado diferentes tipos de mecanismos en patógenos que afecten la eficiencia del fungicida. Uno de los

cambios más comunes suele ser diferentes tipos de mutaciones dentro del gen que codifica para la proteína que son el objetivo de los fungidas DMIs, sin que esto afecte la funcionabilidad de la proteína.(32).

Los mecanismos moleculares de resistencia que se han descrito que poseen los patógenos hacia los fungidas DMIs, en menor frecuencia son: (i) sobre expresión de la proteína objetivo, (ii) activación de una ruta metabólica alterna (iii) una mayor eficiencia en desintoxicación del fungicida y (iv) aumento del flujo de salida del fungicida. (33)

CAPÍTULO 2

2. MARCADORES GENETICOS EN EL ANALISIS DE *Mycosphaerella fijiensis*

Se determina como marcador genético a cualquier fracción física o molecular de ADN, que difiera entre los individuos y pueda ser determinado en laboratorio, como patrón de herencia y de acuerdo a esto se determina como marcadores génicos, a aquellos que formen parte de un gen, o marcadores no génicos a aquellos que forman partes de segmentos no codificantes (34). Existe ADN disperso y repetitivo a lo largo de los cromosomas con un número de repeticiones no muy elevado (aproximadamente entre 10^2 y 10^4) divididas en dos categorías principalmente, la primera repeticiones en tándem o bloques dispersos por el genoma y la segunda en repeticiones igualmente dispersas por todo el genoma, sin agrupaciones en bloques.

De acuerdo a esto se ha usado al ADN repetitivo en tándem (satélites) determinándolos como marcadores moleculares en *M. fijiensis* para el desarrollo de técnicas de detección de genes específicos en comparación con arreglos moleculares de otros hongos del genoma conservado de la misma familia (13, 34)

2.1. Microsatélites o Short Tandem Repeats (SSRs)

Los microsatélites o short tandem repeats son secuencias repetidas inferior a 7pb, agrupadas en tándem en bloques con repeticiones de hasta 50 veces, encontrándose disperso a lo largo de los cromosomas (35, 34). Normalmente los microsatélites no son secuencias codificantes, por lo que se cree que desempeñan un papel de regulación genética (36) o posiblemente como señales en los procesos de conversión genética o recombinación (26).

La técnica de SSRs, es hoy en día muy usada en la caracterización molecular y de variación genética, debido al alto polimorfismo que determina, usando una simple PCR, para poder determinar variaciones entre e intra especies (36, 37)

2.2. Minisátelites o Variable number tandem repeat (VNTRs)

Son repeticiones en tándem en bloques dispersos a lo largo de los cromosomas constituyendo del 5 al 15% aproximadamente del genoma no codificante, con una alta variabilidad entre individuos (34), formado por repeticiones de 10-65pb, ricas en bloques de G+C relativamente grandes de cientos o miles de repeticiones.

Poseen un alto polimorfismo, por lo que generalmente son denominados “ADN minisatélites hipervariable” debido a que no solo existe una alta variación entre individuos si no entre cromosomas homólogos de un mismo individuo, esto sucede debido a que el número de unidades de repetición que forma cada bloque no es siempre el mismo, motivo por el cual se denominan VNTR (Variable Number of tandem repeats). Los VNTR son usados con mucha frecuencia para la determinación de variabilidad entre poblaciones. (34)

2.3. Evolución en las frecuencias alélicas

Se determina como evolución en las frecuencias alélicas, al hecho de que una población posee diversas maneras de obtener cambios en su información genética, que va a estar ligada a diversas condiciones tanto ambientales como de supervivencia y adaptación del hongo.

De acuerdo a esto se determina la frecuencia alélica mediante el equilibrio de Hardy-Weiberg, donde se demuestra que la composición genética se mantiene en equilibrio mientras no actúen ningún factor que produzca alguna mutación (38).

2.3.1. Selección natural

Para miembros de la misma especie que se encuentren dispersos geográficamente, se enfrentaran a diversas condiciones ambientales para cada población agrupada, lo que generara una presión de selección para los organismos exitosos en la adaptación a cada diferente situación ambiental sujeta. Estas adaptaciones sujetas a las condiciones ambientales para cada organismo de las

poblaciones generaran un cambio en su frecuencia alélica a lo largo de un periodo determinado de tiempo.

2.3.2. Mutación

Los organismos de acuerdo a su proceso de adaptación, se ha demostrado que son capaces de alterar y generar pequeños cambios o variaciones dentro de su material genético, determinado como mutaciones, las cuales les suelen otorgar ciertas capacidades a dichos organismos (33).

Existen organismos patógenos que poseen determinadas mutaciones que les confiere la capacidad de disminuir la sensibilidad de ciertos compuestos químicos para su control. (31)

2.3.3. Migración

Una de las formas de generar alteraciones en las frecuencias alélicas dentro de un grupo de organismos de la misma especie, está dada debido a la migración geográfica de dicha especie. Lo que genera una dispersión de genes y entre

cruzamientos con organismos de la misma especie que sean compatibles, aumentando la variabilidad genética de la especie. (34)

2.3.4. Deriva genética

De manera conjunta con la selección y presión de selección natural se mantiene una selección inespecífica de entre cruzamiento para la donación de información genética de manera vertical. Determinando los genes necesarios más hábiles para la supervivencia dentro de una población en constante entrecruzamiento. (34)

2.4. Aplicaciones para la Identificación de Diversidad

Existen diversos estudios realizados para la identificación de la variabilidad genética de en *M. fijiensis*, (23, 26) determinando que poseen una gran capacidad de cambio genético y estos cambios proporcionarles una gran capacidad evolutiva hacia la viabilidad de los patógenos.

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Zonas de muestreo y número de aplicaciones

Para realización de este trabajo se seleccionaron zonas determinadas de recolección de muestras, obteniendo 15 aislados para la provincia de Los Ríos: cinco del sector determinado como Centro, cinco del sector determinado como Sur y cinco de zonas Silvestres. Se obtuvieron 15 aislados de la provincia de El Oro: dos del sector determinado como Centro, cuatro del sector determinado como Norte, cuatro del sector Sur y cinco de zonas Silvestres, también 15 aislados de la provincia del Guayas: ocho del sector determinado como Centro, cinco del sector Sur y dos de zonas silvestres y 15 aislados de la provincia de Esmeraldas: seis del sector Centro, ocho del sector Norte y uno del sector Sur (Anexo B).

Donde las zonas escogidas están determinadas por sectores, y los sectores determinados como silvestre no poseen influencia de ningún sistema de control de la enfermedad, mientras que sectores como centro, norte o sur poseen algún tipo de manejo de la enfermedad de acuerdo a la intensidad de cultivo del banano o plátano (**Tabla II**)

Tabla II
Ciclos de Aplicación de Fungicidas

Área	2003-2006	2007	2008	2009	2010	2011
Zona Sur,	1 5- 17	16 - 18	18 - 22	15 - 19	14 - 18	16 - 22
Machala						
Guayas	8 - 14	8 - 14	12 - 18	12 - 15	12 - 17	13 - 21
Los Ríos	8 - 12	8 - 14	13 - 19	12 - 16	13 - 17	14 - 22
(A)						
Los Ríos	18 - 25	25 - 35	25 - 45	25 - 45	25 - 45	30 - 45
(B)						

3.2. Muestreo

Para la realización del estudio se recolectaron las muestras de hojas de banano infectas de las zonas seleccionadas. Para realizar la recolección se observa las plantaciones y se preseleccionan las

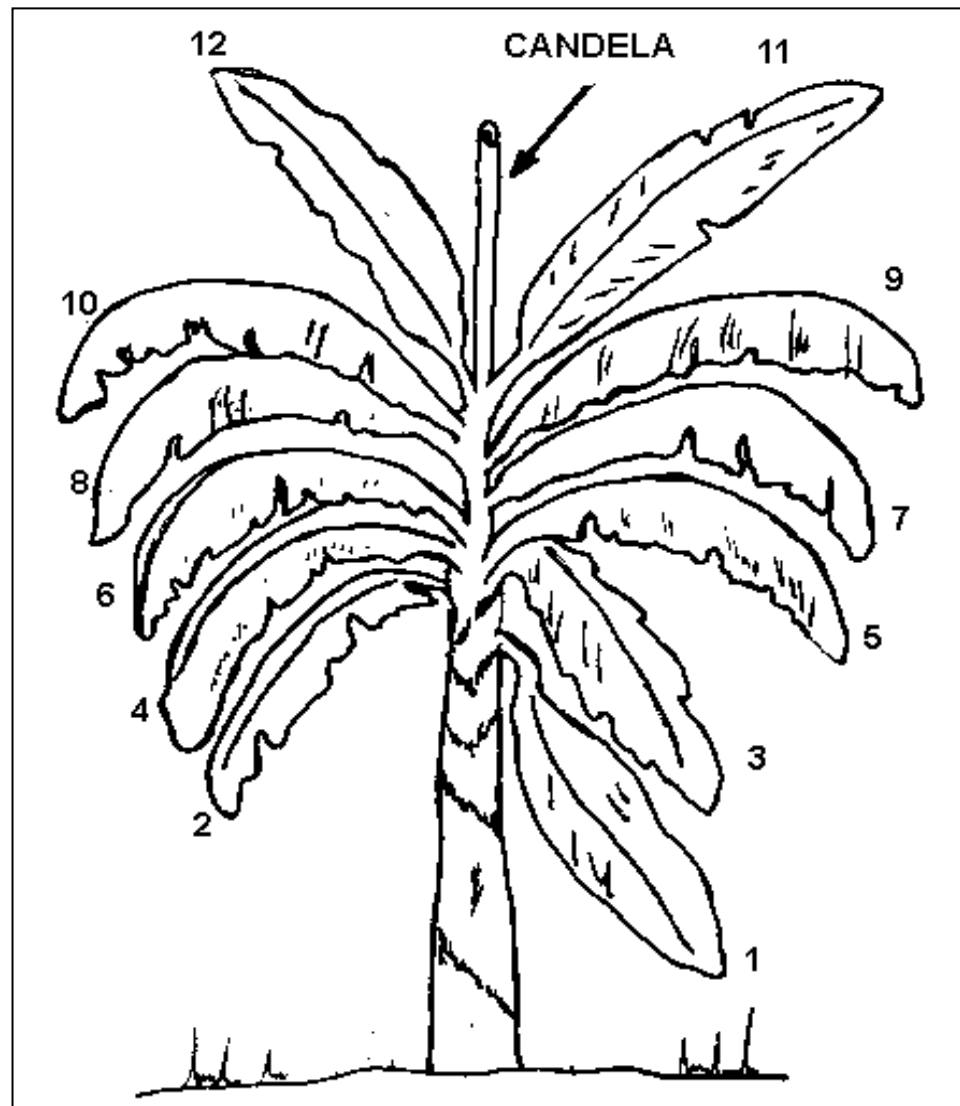
hojas de banano que se encuentren más afectadas especialmente en estadio 6 (Anexo 1), donde las más recomendables son las denominadas hojas bajas, tomando en cuenta la posición de la hoja (FIGURA 2).

Una vez seleccionadas entre 1-3 hojas de la misma planta son introducidas en fundas de papel colocando posición de hoja en la planta y lugar de recolección. Estas son transportadas en un ambiente fresco, evitando siempre el aumento de temperatura (39).

Una vez llevadas al laboratorio se recorta la parte más necrótica de las hojas preseleccionadas y colocadas en discos de papel filtro, con el envés de la hoja hacia el exterior. Las muestras son procesadas aleatoriamente y se generan veinticinco discos de descarga por muestra. Se selecciona a partir de la descarga 5 cajas petri para la obtención de esporas mediante recolección de las mismas. Para este estudio se generaron un total de 60 colonias monoascospóricas de *M. fijiensis*.

FIGURA 2

Hoja Candela o Cigarro de una planta de Banano y las numeraciones de sus hojas



Fuente: Centro Nacional de Cálculo Científico de Venezuela.

3.3. Protocolo de Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis*

El cultivo para crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* se realizó de acuerdo al protocolo descrito por P. Chong (38). Descripción del protocolo completo en (Anexo C).

3.3.1. Medios de Cultivo

Medio Agar agua

Se agregó 4gr. De agar en un litro de agua de –ionizada. De acuerdo a las recomendaciones descritas por el fabricante.

Medio PDA

Se agregó 39gr. De PDA en un litro de agua de –ionizada. De acuerdo a las especificaciones descritas por el fabricante.

Medio V8

- a. Se agregó 300mL de jugo V8, 3gr. De CaCO_3 y 500mL de agua de –ionizada

- b. Se llevo al fuego hasta el punto de ebullición y se dejó durante 30 minutos
- c. Se centrifugó a 2000G durante 10 minutos.
- d. Se recogió el sobrenadante
- e. Se llevo a un volumen total de 1 litro con agua de –ionizada
- f. Y se llevo a la autoclave debidamente cerrado.

Medio PDB

Se agregó 24gr de PDB en un litro de agua de –ionizada. De acuerdo a las recomendaciones descritas por el fabricante.

Medio Mycophil

Se agregó 36gr de Mycophil en un litro de agua de –ionizada. De acuerdo a las recomendaciones descritas por el fabricante.

3.4. Protocolos de Pruebas de Sensibilidad

Para la obtención de la dosis letal media (EC_{50}) de cada uno de los aislados se realizó en base a ensayos descritos anteriormente por

Cañas-Gutiérrez et. al. Y Pelaez et. al. (Pelaez 2006, Cañas-Gutiérrez 2009).

3.4.1. Protocolo de obtención de Micelios para el estudio de sensibilidad en placas de microtitulación de 96 pozos

- a. Se colocó una colonia de aproximadamente 5cm de diámetro en un tubo de 15ml con dos micro esferas de vidrio de 0.25mm de diámetro en una solución de agua con tween20® al 0.05%.
- b. Se dio vortex a la colonia por aproximadamente 1 minuto.
- c. Se tomó 300µL de la solución con micelio e inoculó en una placa con medio mycophil esparciendo la solución con una aza de plástico uniformemente por toda la placa.
- d. Se selló e incubó por una semana a 25°C.
- e. Se colocó de 3 a 5 mL de agua con tween20® al 0.05% en la placa y se raspó la colonia con un pincel #8 previamente estéril.
- f. Se filtró la solución con micelio a través de un filtro de aproximadamente 10µm de ojo de maya, previamente estéril.
- g. Se recogió la solución con micelio en un tubo de 15mL.

- h. Se tomó 10µL de la solución homogenizada y se contó al microscopio en la cámara de Neubauer la cantidad de micelios.
- i. Se llevo a una concentración final de la solución de $1 \cdot 10^5$

3.4.2. Soluciones

Las formulas químicas usadas (DMI, Inhibidores de Desmetilación), fueron Propiconazol y Epoxyconazol en las concentraciones determinadas (3.16, 1.78, 1.00, 0.56, 0.31, 0.17, 0.10, 0.00ppm, para cada uno de los fungicidas analizados respectivamente)

3.5. Protocolos de Extracción de ADN

Para la extracción se usó el kit DNeasy® plant handbook, DNeasy 96 Plant kit, siguiendo las especificaciones del fabricante, descripción de protocolo completo en Anexo .Alternativamente se realizó la extracción con protocolo descritos por DellaPorta y Alijanabi (42), modificados por Santos, descripción de protocolo completo en Anexo.

3.5.1. Soluciones

Tampón de extracción de ADN

- 100mM TRI-HCl, pH 8.0
- 50mM EDTA
- 500mM NaCl
- 10mM B-Mercaptoetanol
- 2% PVP (Polyvinyl pyrrolidone, MW 10.000)

Acetato de Potasio

- 47.07 gr.
- 52.93 mL de agua de-ionizada

Cloruro de Sodio

- 350.64 gr
- 649.36mL de agua de-ionizada

3.6. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante un análisis espectrofotométrico, con el uso de Biotek, Synergy HT, Gen5. Siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se determinó la calidad del ADN extraído, por medio de un gel de agarosa al 1%, descrito en la **Tabla III**.

Tabla III
Gel de Agarosa al 1%

Reactivo	Cantidad/Volumen
Agarosa (gr)	0,03
Agua de-ionizada (mL)	30
SYBR Safe 10.000X (µL)	3

3.7. Secuencia de Iniciadores o Primers

Para la realización de la caracterización molecular del genoma de *M. fijiensis* se utilizaron 26 microsatélites (SSR) y 4 minisatélites (VNTRs), descritos en la Tabla IV.

Tabla IV
Descripción de Primers

Locus	Nombre	Posición Genómica	Tamaño Esperado	Secuencia	Unidad de Repetición	Referencia
MfSSR005	Scaffold_1	158	F: TCCAAATTCATCGTTGTCA	(CAACACA)4	Neu <i>et al.</i> , (1999)	
			R: CGATGATTTGGGTGGTCAAGCTA			
MfSSR025	Scaffold_2	176	F: CATGACTGACGTCTCTTCTCA	(CA)18	Neu <i>et al.</i> , (1999)	
			R: ATATGGGAAGGGGAAAGGTG			
MfSSR350	Scaffold_3	222	F: AAGGCGTTGGTTGTGTA	(GAA)3(...)(CA)	Zapater <i>et al.</i> , (2008)	
			R: GCTTGCGTTCTGTCGCTCA	9		
MfSSR428	Scaffold_4	134	F: AGGATTACCCGCAGAACAAAG	(GAAG)5	Robert <i>et al.</i> , (2010)	
			R:GGGTCTAGGGAATGCCTACT			
MfSSR175	Scaffold_5	286	F: AACCTCACATAGGCTGCCAC	(CA)1 6(CT)1	Neu <i>et al.</i> , (1999)	
			R:TATACCTTTTCGTTCCGGCCTG	3(CA)2 7		
MfSSR203	Scaffold_6	227	F: CTCTGTGGCGTAAGTGGGTG	(GTT)10	Neu <i>et al.</i> , (1999)	
			R: TGATTGCACAGCAGGAAGAG			
VNTR_133 3	Scaffold_7	337	F: GAGTGAAGTACTGCGGAGGC	(CGCCTT)12	Garcia <i>et al.</i> , (2010)	
			R: AGTTGGAGAAAGGCCGAAAGG			
MfSSR244	Scaffold_8	215	F: GGCCATTTTCATTGCAAGAC	(TG)29	Neu <i>et al.</i> , (1999)	
			R: ATGCCACAAAATCTCCATCC			
MfSSR355 _1	Scaffold_9	149	F: CGACCATGCCAAGCGTTTC	(GT)7	Zapater <i>et al.</i> , (2008)	
			R: TGCCACTAGAGGAGACAGC			
MfSSR403	Scaffold_10	196	F:TAGTGGTTGGCGGATATGGT	(CAAG)14	Robert <i>et al.</i> , (2010)	
			R: AGGCTCAGCTCATCGGTAGA			
Mfsc11_2	Scaffold_11	166	F: TGTTCCAGACCGAGCAGTACG	(CCG)7	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)	
			R: AGGAGAGCTGACAGGACGAA			
MfSSR405	Scaffold_12	116	F: TGTTCCAGGAGCAAGACAAG	(CATT)6	Robert <i>et al.</i> , (2010)	
			R: GATGGTATGGCGTGGTCTCT			

Mfsc13_1	Scaffold_ 13	459	F: ACTGACGACTATGCCGGAGT	(CTC)11	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: AGAGGAGGGCAGAAAAGAGC		
MfSSR323	Scaffold_ 14	220	F: GGCTGGGTTTGATGTTGAGT	(CTT)3(...)(GT) 6(...)(GA)4A(G A)1	Zapater <i>et al.</i> , (2008)
			R: CGCGACGTCTTCTCTCTCTT		
MfSSR412	Scaffold_ 15	172	F: CGGGGTCTCGGTATCAAGTA	(TTGC)7	Robert <i>et al.</i> , (2010)
			R: CGTGTTACGCTTGATTGTGG		
Mfsc16_1	Scaffold_ 16	199	F: CCAGAACAAGATGTAGCGCA	(CCA)8	**Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: CAAAGGATGGAGTATGGCGT		
MfSSR52	Scaffold_ 17	220	F: GGACCTCTTCGACCTCCTTAT	(AGT) ₁₄	Jun Yang, Bin Zhang (2008)
			R: CCGAGGGACGCTACTACTACT		
Mfsc18_3	Scaffold_ 18	279	F: TTTTGCAACGCTGAATCAAG	(GCT)7	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: TGCTAAAGCGGAGAGAGAGG		
Mfsc19_2	Scaffold_ 19	457	F: AGTTCGCATCTCTGCCTGAT	(GAT)12	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: TGGTGTGAGAGCATGTTGGT		
Mfsc20_2	Scaffold_ 20	222	F: TAAAGGCCGGTAGTGTTCG	(CTA)9	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: GCAATCGACTTTGCCCTAGA		
MfSSR62	Scaffold_ 21	231	F: GCTGGTTGGATTTTCGACAT	(ATG) ₁₅	Jun Yang, Bin Zhang (2008)
			R: CGGCCTCGATTTTCTTTACA		
Mfsc22_2	Scaffold_ 22	229	F: GTTCGGGTAGGGGAGAAGAG	(AGA)7	**Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: AGGCATCTTGTAGCGGAGAA		
Mfsc22_3	Scaffold_ 22	446	F: CTCCTGGTTCTTCTCTCCC	(GAG)51	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: GTCCCAAGCTATGCACGAAT		

Mfsc22_4	Scaffold_ 22	477	F: TAGGGTGGATTGGAGTCAGG	(TCC)8	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: CATTGAGGATGAGCTCGACA		
Mfsc24_1	Scaffold_ 24	120	F: TTGCAAAGCGGTAGAACCT	(GA)10	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: GAGGCAATAGCGTCGATACC		
Mfsc24_2	Scaffold_ 24	270	F: TGTAGGTTAACCGCCGGTAG	(TTA)7	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: CGCGCCTTATATCGTACCTC		
Mfsc25_1	Scaffold_ 25	479	F: ACCGCCTTACCTTAGCTTCC	(TA)10	*Cortesía Pablo Chong, <i>et. al</i> (2011)
			R: CCGGGGCATAGTGATTGTAT		
VNTR_378 6	Scaffold_ 34	344	F: GCAGCGGAGTGCTAGTAACC	(AGTGGAAAGA)	Garcia <i>et al.</i> , (2010)
			R: CGCGCTTTTGACTCTTCTTC	8	
VNTR_383 1	Scaffold_ 35	350	F: AGCCCCGAAGGAGGGTAG	(TAGAAAGAA	Garcia <i>et al.</i> , (2010)
			R: CGAGCCTACGACTAGCCCG	AATAGC)8	
VNTR_395 9	Scaffold_ 38	242	F: GCGCGAGGCTTTCTATCTC	(TATCTT)11	Garcia <i>et al.</i> , (2010)
			R: ACCCCGATTAGGGAAGGTC		

3.8. Protocolo de PCR

Los protocolos para la preparación de PCR mix y programas de PCR que fueron usados están basados en descripción hecha por Chong (19), (Tabla V y Tabla VI)

Tabla V
Protocolo Para Preparación de PCR Mix

Solución Stock	Concentración Final	Volumen Final (μ l)
Tampón Taq. 10X	1X	2
MgCl ₂ 50mM	1.5mM	0,6
dNTPs 10mM	0,2mM	0,4
Primers F 10 μ M	0,24 μ M	0,48
Primers R 10 μ M	0,24 μ M	0,48
Taq DNA polimerasa	1U	0,26
Templete DNA	5-10ng/ μ l	2
H ₂ O Desionizada	--	13,78
Volumen total	--	20 μ L

Tabla VI
Protocolo de Programa de PCR

Paso	Ciclos	
1	1	94°C por 4min
2	30	{ 94°C por 30seg { 55°C por 45seg { 72°C por 45seg
3	1	72°C por 7min
4	1	4°C (Hold)

3.9. Análisis de Datos

3.9.1. Análisis de Sensibilidad

Los resultados obtenidos de sensibilidad fueron ordenados y clasificados en Excel, y se determinó el LC-50 de cada uno de los aislados mediante el programa Kyplot v2.0 beta 13 disponible de manera libre en la web. Los datos de LC-50 generados se realizaron tablas de crecimiento entre todos los aislados para determinar los aislados considerados como susceptibles (≤ 0.10 mg/L), aislados considerados como tolerantes (0.19-1.15 mg/L) y aislados considerados como resistentes (≥ 1.32 mg/L) (5). Luego de establecer cada cepa como susceptible, tolerante o resistente a cada uno de los compuestos químicos usados para la evaluación estas categorías fueron analizadas mediante el programa de análisis estadístico "infoStat", que se encuentra libre en la web www.infostat.com.ar, determinando la correspondencia de los aislados de acuerdo a sus características establecidas para dicha prueba. El análisis de correspondencia nos va a determinar que tan similares o correlacionadas se encuentran

las poblaciones como los aislados entre ellos, de acuerdo tanto a su procedencia como a sus características.

3.9.2. Análisis de la Caracterización Molecular

Para realizar el análisis de caracterización molecular, se ordenaron los datos de acuerdo a cada uno de los locus determinados como por su procedencia, aislados de las cepas tomadas como referencia para el análisis, estos datos obtenidos como un tamaño de amplificación para cada locus, se generó una matriz la cual fue analizada mediante el programa Popgene Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, que se encuentra de manera libre en la web. Este análisis generado nos permite determinar tanto la distancia genética, flujo genético, frecuencia alélica, entre otras indispensables para ver la variación encontrada tanto entre las poblaciones como dentro de cada una de ellas para cada respectivo locus estudiado.

3.9.3. Análisis de Secuenciación

Una vez obtenidas las secuencias de los aislados escogidos entre las poblaciones de Ecuador estudiadas con mayor predominancia en conjunto con las cepas determinadas como referencia para este estudio, se realizó el análisis mediante el uso del programa CLC Genomics Workbench versión 4.8. Se generaron arboles filogenéticos basados en la secuencias tanto nucleótido como en su traducción a proteína (secuencia de aminoácidos). Para la obtención de estos árboles se genero en base el algoritmo de Neighbor Jonning.

En los árboles generados se incluyeron secuencias que se encuentran de manera libre en la base mundial de datos *Mycosphaerella fijiensis* V2.0, de de esta manera se generó un BlastX, basados en el código genético "Mol' Mitochondrial, tabla 4".

CAPÍTULO 4

4. Resultados y Discusión

4.1. Análisis de Sensibilidad

Las cepas estudiadas mostraron una alta variabilidad de respuesta frente a las moléculas utilizadas en el experimento, en las que se observó que algunas cepas pertenecientes a las zonas de la provincia de Esmeraldas (muestras utilizadas como control silvestre) poseen valores de resistencia medios y altos a los compuestos triazoles, Epoxiconazol y Propiconazol, respectivamente. Aunque en su mayoría las cepas procedentes de esta región fueron sensibles a los dos compuestos. Cepas perteneciente a las provincias del Guayas, El Oro y los Ríos poseen un mayor número de asilados resistentes a Propiconazol (46.67%, 46.67%, 46.67%, respectivamente) que a Epoxiconazol (13.33%, 0.0%, 0.0%, respectivamente) como lo muestra las Tabla VII y Tabla VIII. Al

realizar el análisis para cada aislado estudiado dentro de cada una de las poblaciones de Ecuador, se muestra que la población de Esmeraldas es quien posee el mayor número de aislados susceptibles correspondían tanto para el Fungicida Epoxiconazole como para el fungicida Propiconazole, (Tabla VII y Tabla VIII).

Tabla VII

Análisis Sensibilidad Epoxiconazole

	Esmeraldas		Guayas		El Oro		Los Ríos		Total	
	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje
Sensible	11,00	73,33	5,00	33,33	11,00	73,33	7,00	46,67	34,00	51,52
Tolerante	3,00	20,00	8,00	53,33	4,00	26,67	8,00	53,33	23,00	34,85
Resistente	1,00	6,67	2,00	13,33	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00	4,55

Tabla VIII

Análisis de Sensibilidad Propiconazole

	Esmeraldas		Guayas		El Oro		Los Ríos		Total	
	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje	Total	Porcentaje
Sensible	10,00	66,67	1,00	6,67	2,00	13,33	2,00	13,33	15,00	22,73
Tolerante	2,00	13,33	7,00	46,67	6,00	40,00	6,00	40,00	21,00	31,82
Resistente	3,00	20,00	7,00	46,67	7,00	46,67	7,00	46,67	24,00	36,36

Al obtener el análisis para el total de las poblaciones de Ecuador se puede identificar de manera más clara como se encuentran constituidas las poblaciones según sus características de sensibilidad ante los fungicidas tanto para Epoxiconazole en la FIGURA 3 y Propiconazole en la FIGURA 4. La población total se encuentra constituida por un 57% de aislados susceptibles a la molécula química Epoxiconazol como se muestra, dentro de los cuales los aislados más representativos se encuentran dentro de la población de Guayas.

No existen aislados que muestre una resistencia total hacia el fungicida epoxiconazole, y en su mayoría la población se encuentra constituida por aislados que muestran susceptibilidad hacia el compuesto evaluado.

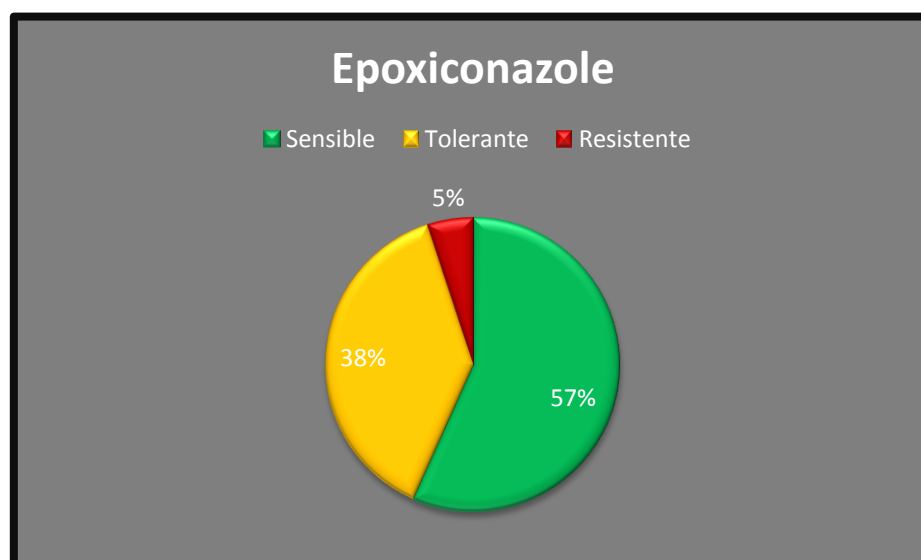


FIGURA 3: Diagrama obtenido según los resultados de sensibilidad para el fungicida epoxiconazole obtenidos de las poblaciones de Ecuador, discriminando las cepas referencia para este análisis.

En las pruebas de sensibilidad para la fórmula química Propiconazole se constató una pérdida de la sensibilidad en la mayoría de las poblaciones, y a pesar que existieron aislados con valores de respuesta determinados como susceptibles, la mayor parte de la población se encuentra constituida por aislados resistentes a dicha molécula. Este resultado corrobora la fuerte presión de selección ejercida por el uso extensivo de Propiconazol en las principales zonas de producción bananera, como Guayas, El Oro y Los Ríos, los detalles de cada aislado se encuentran en el Anexo D.

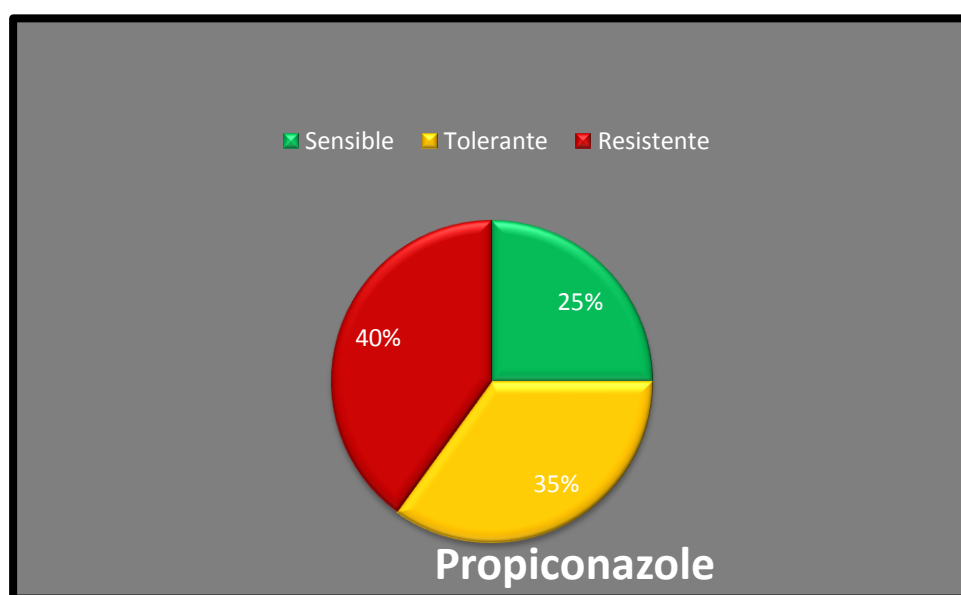


FIGURA 4: Diagrama obtenido según los resultados de sensibilidad para el fungicida propiconazole obtenidos de las poblaciones de Ecuador, discriminando las cepas referencia para este análisis

Se encontraron aislados de Ecuador (GCSA-4, GSB-6) que poseen características similares de resistencia hacia epoxiconazole que las cepas referencia (Ca10_13, Ca5_16), mientras que otras cepas poseían una resistencia parcial también consideradas como tolerantes o con resistencia baja hacia el compuesto evaluado (epoxiconazole). Se considera basados en los experimentos de sensibilidad que las poblaciones de Ecuador usadas en el experimento son mayormente susceptibles a este fungicida con rangos de inhibición de crecimiento de ≤ 0.10 mg/L y valores LC-50 similares a las cepas referencia provenientes de Camerún (C-86) y la Amazonía de Brasil (AM_68) como se puede observar de manera más clara en la FIGURA 5.

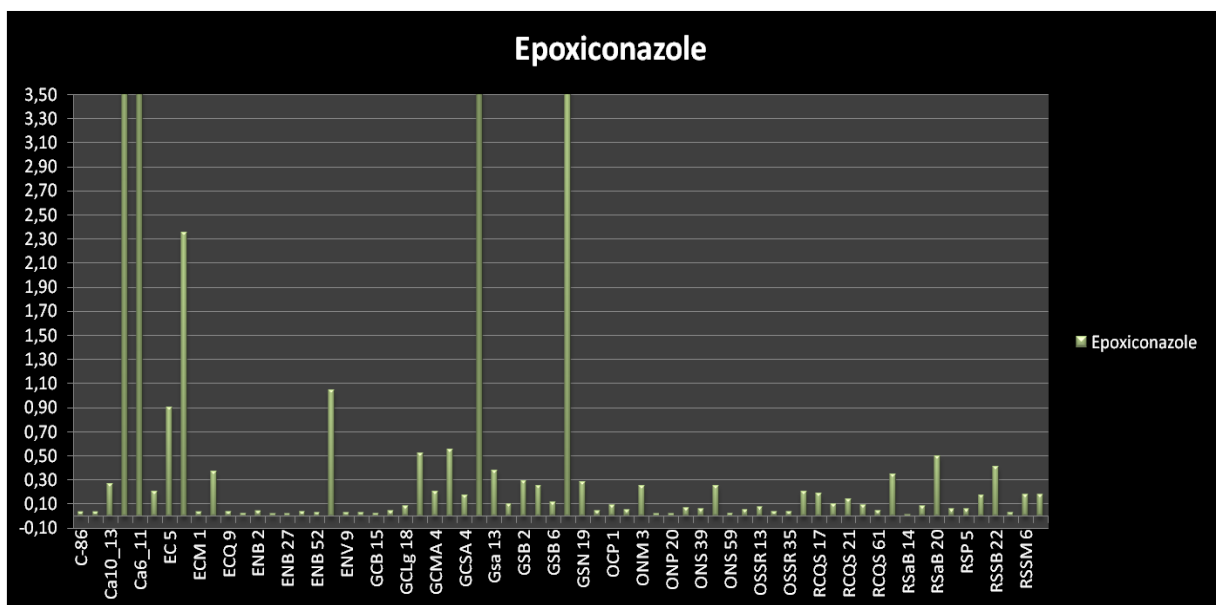


FIGURA 5: Diagrama de aislados con su respectivo LC-50 en mg/L para cada uno hacia el fungicida evaluado (Epoxiconazole)

Los resultados de los experimentos de sensibilidad para propiconazole, mostraron que en las poblaciones de Ecuador existen valores muy altos de resistencia al fungicida, en comparación con las cepas referencia. Se obtuvo dos aislados del sector de Esmeraldas que poseían un alto valor de LC-50 para la resistencia a este compuesto $\leq 20\text{mg/L}$ (FIGURA 6 y Anexo D).

La proporción de individuos resistentes fue mayor en las zonas con mayor presión de selección (Guayas, El Oro y Los Ríos), ejercida por los controles convencionales, que comparten el mismo número de aislados que mostraron resistencia, pero los valores más representativos se encontraron en Guayas y Los Ríos con valores mayores a 20mg/L , y consecuentemente un menor número de cepas susceptibles se encuentra dentro de la población del Guayas (6.67%) (Anexo D).

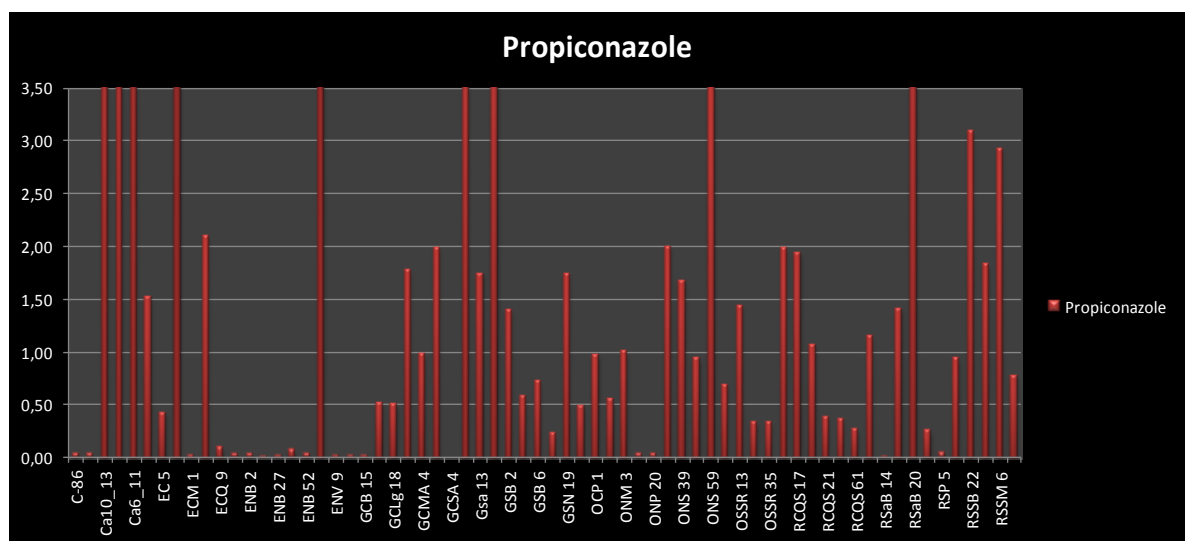


FIGURA 6: Diagrama de aislados con su respectivo LC-50 en mg/L para cada uno hacia el fungicida evaluado (Propiconazole).

Para las pruebas de sensibilidad al realizar el análisis multivariado de correspondencia para cada uno de los aislados del Ecuador en comparación con las cepas referencias para este estudio, se obtuvo que los datos que se encuentran graficados, de las poblaciones de Ecuador en su mayoría de Esmeraldas (66.66%), El Oro (13.13) y Los Ríos (13.13%) poseen la misma característica de sensibilidad hacia los dos fungicidas evaluados que las cepas referencia perteneciente a la Amazonía de Brasil (AM_68) y a Camerún (C-86) (FIGURA 7).

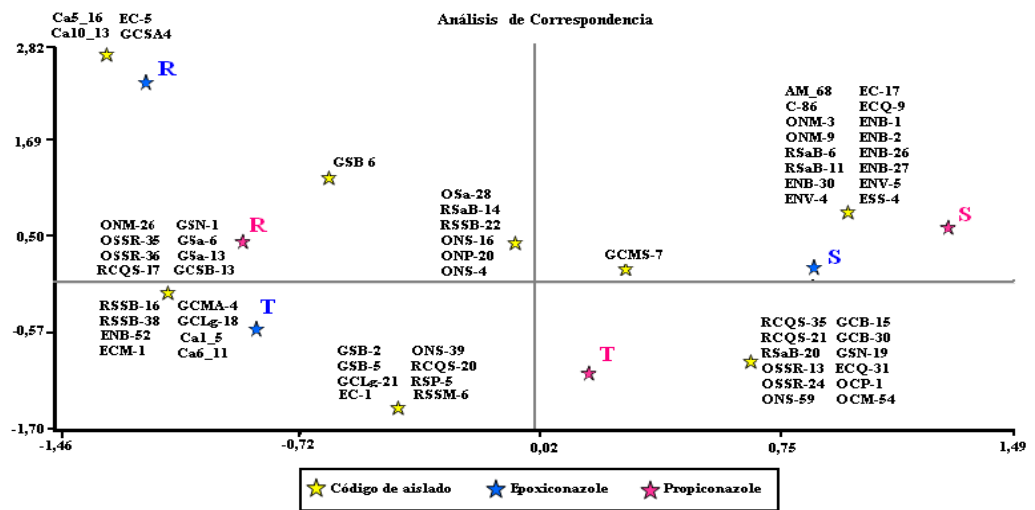


FIGURA 7: Análisis de correspondencia para todos los aislados del Ecuador y las cepas referencia, agrupados de acuerdo a sus características de sensibilidad hacia los compuestos evaluados (Epoxiconazole y Propiconazole)

Y la mayoría de la población del Guayas (40%), El Oro (20%) y Los Ríos (20%) poseen la característica de ser resistentes hacia el fungicida propiconazole y tolerante o resistentes parcialmente hacia el fungicida evaluado epoxiconazole, resultados mostrados en la FIGURA 7.

De la misma manera el análisis de correspondencia realizado en base a la característica más sobresaliente en cada una de las poblaciones de Ecuador y las cepas tomadas como referencia hacia los fungicidas evaluados (Epoxiconazole y Propiconazole), se generaron grupos bien marcados colocando a la poblaciones del Guayas y Los Ríos junto con cepas referencia provenientes de Costa Rica (Ca1_5, Ca6_11), por ser tolerante hacia el fungicida Epoxiconazole y resistentes hacia Propiconazole.

Los individuos de Costa Rica (Ca10_13, Ca5_16) se encuentran separados de las poblaciones de Ecuador por tener características diferentes hacia los fungicidas al resistente hacia los dos compuestos fungicidas que fueron evaluados. La población de Esmeraldas se ubicó en un mismo grupo con aislados de la Amazonía de Brasil y Camerún (cepas referencia Am_68 y C-86, respectivamente) por ser sensibles hacia los dos compuestos fúngicos.

De manera excluida se obtuvo que la población de El Oro está ubicada independientemente de los demás aislados evaluados, por poseer la característica de ser resistente ante Propiconazole mientras que, para epoxiconazole fue susceptible (FIGURA 8)

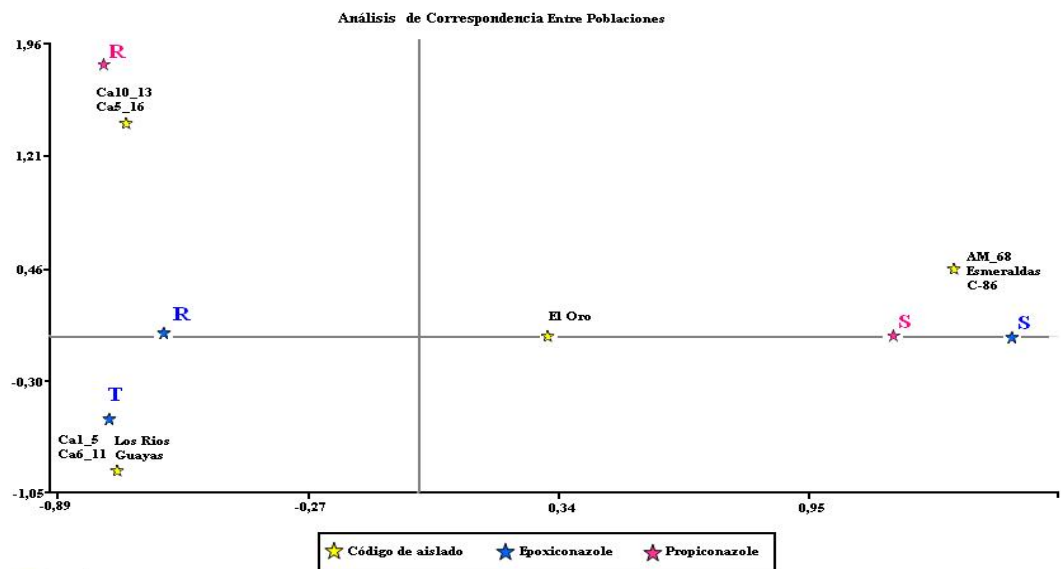


FIGURA 8: análisis de correspondencia para las poblaciones y las cepas referencia, de acuerdo a las características mostradas en conjunto para cada población del Ecuador ante los fungicidas evaluados (Epoxiconazole y propiconazole)

4.2. Análisis de Caracterización Molecular

Al realizar el análisis de caracterización molecular con los primers microsatélites se obtuvo, dentro de las poblaciones de Ecuador una gran diversidad entre los aislados. Obteniendo locus con un gran

número de alelos para ciertos sectores donde se obtienen que los loci con mayor número de alelos fueron Mfsc13_1 con un número de alelo de hasta 7 para la provincia del Guayas en el Ecuador, el locus Mfsc22_4 con un número de hasta 6 alelos para el sector de El Oro y el locus VNTR_3831 con un número de alelos hasta 6 para el sector del Guayas, como se muestra en la Tabla IX de manera más detallada.

Los loci MSSR350 y Mfsc13_1, debido al alto polimorfismo presentado y/o inexistencia dentro de la población, no fueron incluidos en los análisis estadísticos de diversidad genética, frecuencia genética, distancia genética entre otros. (Anexo H).

Los loci MfSSR005, VNTR_133, MfSSR405, MfSSR323, MfSSR52, MfSSR62, Mfsc24_1 y Mfsc25_1 mostraron la misma cantidad de alelos tanto para las cepas referencia como para los aislados analizados del Ecuador.

Existieron loci como MfSSR428, Mfsc24_2, Mfsc18_3 y Mfsc19_2 que se encontraban ausentes para ciertas poblaciones. Mientras que el loci MfSSR350 no pudo ser encontrado para ninguno de los

aislados estudiados, ya sea en la población del Ecuador o en las cepas determinadas como referencia en el estudio (Tabla IX).

Tabla IX

Tabla de Comparación de Número de alelos entre Las poblaciones de Ecuador con Cepas Referencia

locus	Repetición	Tamaño Esperado (pb)	Cepas Referencia	Número de alelos			
				Esmeraldas	Guayas	El Oro	Los Ríos
MfSSR005	(CAACACA)4	158	2	2	2	2	2
MfSSR025	(CA)18	176	3	2	1	2	2
MfSSR350	(GAA)3(...)(CA)9	222	0	0	0	0	0
MfSSR428	(GAAG)5	134	2	1	3	0	1
MfSSR175	(CA)16(CT)13(CA)27	286	2	3	4	3	3
MfSSR203	(GTT)10	227	2	2	2	3	3
VNTR_133_3	(CGCCTT)12	337	4	4	4	4	4
MfSSR244	(TG)29	215	4	6	5	4	5
MfSSR355_1	(GT)7	149	2	2	2	1	1
MfSSR403	(CAAG)14	196	4	2	2	2	2
Mfsc11_2	(CCG)7	166	1	1	2	1	1
MfSSR405	(CATT)6	116	1	1	1	1	1
Mfsc13_1	(CTC)11	459	3	4	7	6	6
MfSSR323	(CTT)3(...)(GT)6(...)(GA)4A(GA)1	220	1	1	1	1	1
MfSSR412	(TTGC)7	172	1	1	1	1	2
Mfsc16_1	(CCA)8	199	2	2	2	2	3

MfSSR52	(AGT) ₁₄	220	2	2	2	2	2
Mfsc18_3	(GCT) ₇	279	1	1	2	1	0
Mfsc19_2	(GAT) ₁₂	457	1	1	1	1	0
Mfsc20_2	(CTA) ₉	222	2	1	2	2	2
MfSSR62	(ATG) ₁₅	231	1	1	1	1	1
Mfsc22_2	(AGA) ₇	229	1	3	3	2	1
Mfsc22_3	(GAG) ₅₁	446	1	4	3	2	1
Mfsc22_4	(TCC) ₈	477	5	5	4	6	1
Mfsc24_1	(GA) ₁₀	120	1	1	1	1	1
Mfsc24_2	(TTA) ₇	270	2	4	2	0	0
Mfsc25_1	(TA) ₁₀	479	1	1	1	1	1
VNTR_378 6	(AGTGGAAGA) ₈	344	2	2	3	2	2
VNTR_383 1	(TAGAAAGAAAATAGC) ₈	350	2	3	6	3	4
VNTR_395 9	(TATCTT) ₁₁	242	3	4	2	3	3

Al realizar el análisis de frecuencia alélica se obtienen que los alelos que se encuentran en las cepas referencia de los loci Mfsc22_3 y VNTR_3831 no se encuentran presentes dentro de la población del Ecuador como se muestra en la Tabla X (Anexo J).

Donde los loci que presentaron menor frecuencia fueron MfSSR405, MfSSR323, Mfsc20_2, Mfsc22_2, Mfsc24_1 y Mfsc25_1, presentando solo un alelo para todas las poblaciones del Ecuador y de las cepas referencia.

Tabla X
Frecuencia Alélica Para Loci

Allele \ Locus	VNTR_1333	MfSSR244	MfSSR405	MfSSR323	Mfsc20_2	Mfsc22_2	Mfsc22_3	Mfsc22_4	Mfsc24_1	Mfsc24_2	Mfsc25_1	VNTR_3831
Allele 1	0.1000	0.0167	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		0.1795	1.0000	0.0769	10000	0.3103
Allele 2	0.1333	0.1000					0.0196	0.1795		0.2308		0.0345
Allele 3	0.3333	0.0167					0.0196	0.0256		0.0769		0.1379
Allele 4	0.2333	0.1833					0.1569	0.0513		0.1538		0.2414
Allele 5	0.1833	0.1333					0.7451	0.0769		0.3846		0.2069
Allele 6	0.0167	0.3500					0.0588	0.1026		0.0769		
Allele 7		0.0833						0.1026				0.0690
Allele 8		0.1167						0.1026				
Allele 9								0.1795				

Los loci más estables fueron Mfssr005, MfSSR175, VNTR_133, MfSSR244 y Mfsc25_1, los cuales fueron encontrados en todos los aislados estudiados, tanto para la población de Ecuador como para las cepas tomadas como referencia (Tabla XI). Donde se observa que el locus como mayor diversidad genética es Mfsc22_4 (0,8626), y la media de diversidad dentro de la población del Ecuador es igual a 0,4202 para todos los loci, con una desviación estándar de 0,2974.

Tabla XI

Resumen Estadístico de la Variación Genética para todos los loci

Locus	tamaño de muestra	na*	ne*	h*	I*
MfSSR005	60	2,00	1,7630	0,4328	0,6243
MfSSR025	58	2,00	1,2270	0,1855	0,3326
MfSSR428	8	3,00	2,4615	0,5938	0,9743
MfSSR175	60	4,00	3,8870	0,7428	1,3722
MfSSR203	59	3,00	2,4705	0,5952	0,9725
VNTR_1333	60	6,00	4,4010	0,7728	1,5839
MfSSR244	60	8,00	4,8780	0,7950	1,7716
MfSSR355_	36	2,00	1,6000	0,3750	0,5623
MfSSR403	36	4,00	3,7457	0,7330	1,3547
Mfsc11_2	34	2,00	1,1245	0,1107	0,2237
MfSSR405	56	1,00	1,0000	0,0000	0,0000
MfSSR323	52	1,00	1,0000	0,0000	0,0000
MfSSR412	58	2,00	1,4438	0,3074	0,4857
Mfsc16_1	15	2,00	1,9231	0,4800	0,6730
MfSSR52	50	3,00	2,1815	0,5416	0,9227
Mfsc18_3	17	3,00	2,3120	0,5675	0,9587
Mfsc19_2	21	2,00	1,0998	0,0907	0,1914
Mfsc20_2	25	1,00	1,0000	0,0000	0,0000

MfSSR62	53	2,00	1,9936	0,4984	0,6915
Mfsc22_2	51	1,00	1,0000	0,0000	0,0000
Mfsc22_3	51	5,00	1,7123	0,4160	0,8307
Mfsc22_4	39	9,00	7,2775	0,8626	2,0692
Mfsc24_1	43	1,00	1,0000	0,0000	0,0000
Mfsc24_2	13	6,00	4,1220	0,7574	1,5858
Mfsc25_1	60	1,00	1,0000	0,0000	0,0000
VNTR_3786	57	3,00	2,3290	0,5706	0,9592
VNTR_3831	29	6,00	4,4973	0,7776	1,6060
VNTR_3959	49	4,00	2,2932	0,5639	0,9990
Mean	43	3,18	2,3837	0,4202	0,7766
St. Dev		2,16	1,5477	0,2974	0,6146

*na= Número de alelos observados

*ne = Número de alelos efectivos [Kimura and Crow (1964)]

*h = Diversidad genética según Nei's (1973)

*I = Información del Índice de Shanon [Lowontin (1972)]

[See Nei (1987) Molecular Evolutionary Genetics (p. 176-187)]

Tabla XII

Sumario de G-statics y Gene Flow (flujo Genético) para todos los loci

Locus	Tamaño de Muestra	Ht	Hs	Gst	Nm*
MfSSR005	60	0.4328	0.3689	0.1476	2.8870
MfSSR025	58	0.1895	0.1765	0.0683	6.8240
MfSSR428	8	0.5511	0.1867	0.6613	0.2561

MfSSR175	60	0.7428	0.5511	0.2580	1.4377
MfSSR203	59	0.5944	0.4628	0.2214	1.7582
VNTR_1333	60	0.7728	0.6711	0.1316	3.3005
MfSSR244	60	0.7950	0.7467	0.0608	7.7241
MfSSR355_	36	0.2657	0.2088	0.2142	1.8346
MfSSR403	36	0.7021	0.4079	0.4190	0.6932
Mfsc11_2	34	0.1528	0.1111	0.2727	1.3333
MfSSR405	56	0.0000	0.0000	****	****
MfSSR323	52	0.0000	0.0000	****	****
MfSSR412	58	0.3099	0.2534	0.1822	2.2435
Mfsc16_1	15	0.4644	0.1911	0.5885	0.3496
MfSSR52	50	0.5484	0.4323	0.2117	1.8618
Mfsc18_3	17	0.5651	0.5035	0.1091	4.0845
Mfsc19_2	21	0.0644	0.0600	0.0690	6.7500
Mfsc20_2	25	0.0000	0.0000	****	****
MfSSR62	53	0.5000	0.2737	0.4527	0.6046
Mfsc22_2	51	0.0000	0.0000	****	****
Mfsc22_3	51	0.3845	0.3236	0.1584	2.6558
Mfsc22_4	39	0.8467	0.5330	0.3705	0.8494
Mfsc24_1	43	0.0000	0.0000	****	****
Mfsc24_2	13	0.7602	0.6395	0.1588	2.6479
Mfsc25_1	60	0.0000	0.0000	****	****
VNTR_3786	57	0.5771	0.4004	0.3061	1.1332
VNTR_3831	29	0.7829	0.6687	0.1459	2.9272
VNTR_3959	49	0.5646	0.5454	0.0339	14.2374

Mean	43	0.4131	0.3113	0.2465	1.5286
St. Dev		0.0875	0.0577		

*Nm = Flujo genético estimado en base al G_{st} o G_{cs} . Según McDermott and McDonald, Am. Rev. Phytopathol. 31:353-373 (1993).

El número polimórfico de loci es: 22

El porcentaje polimórfico de loci es: 78.57

En el análisis de la identidad y distancia genética (Tabla XIII) se puede observar la diversidad genética que existe entre las poblaciones del Ecuador para los loci estudiados, determinando una menor identidad con los aislados de la población de Esmeraldas en comparación con los aislados de las demás provincias del Ecuador.

Donde, dentro de la población del Ecuador existen sectores como Guayas y El Oro que poseen una distancia genética de 0.1237, ubicándolos como poblaciones muy similares y sectores como Los Ríos y Esmeraldas con una distancia de 0.3264 determinándolos como poblaciones diferentes dentro de la escala genética de diversidad (FIGURA 9).

Tabla XIII

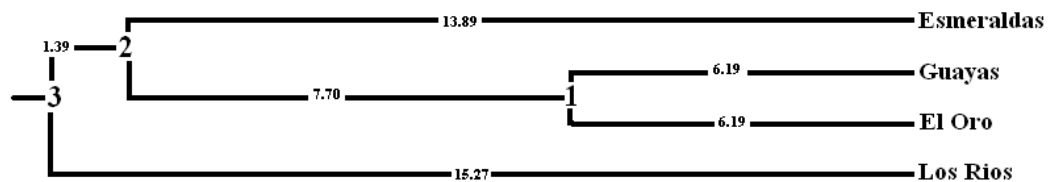
Distancia e Identidad Genética de Medidas Originales según Nei's

Población	Esmeraldas	Guayas	El Oro	Los Ríos
Esmeraldas	****	0.7911	0.7253	0.7215
Guayas	0.2344	****	0.8836	0.7353
El Oro	0.3211	0.1237	****	0.7539
Los Ríos	0.3264	0.3075	0.2825	****

Identidad genética (Sobre la diagonal) y la distancia genética (debajo de la diagonal).
[See Nei (1972) Am. Nat. 106:283-292]

FIGURA 9

Dendograma Basado en la Distancia Genética según Nei's (1972)



Based en Nei's (1972), Modified from NEIGHBOR procedure of PHYLIP Version 3.5

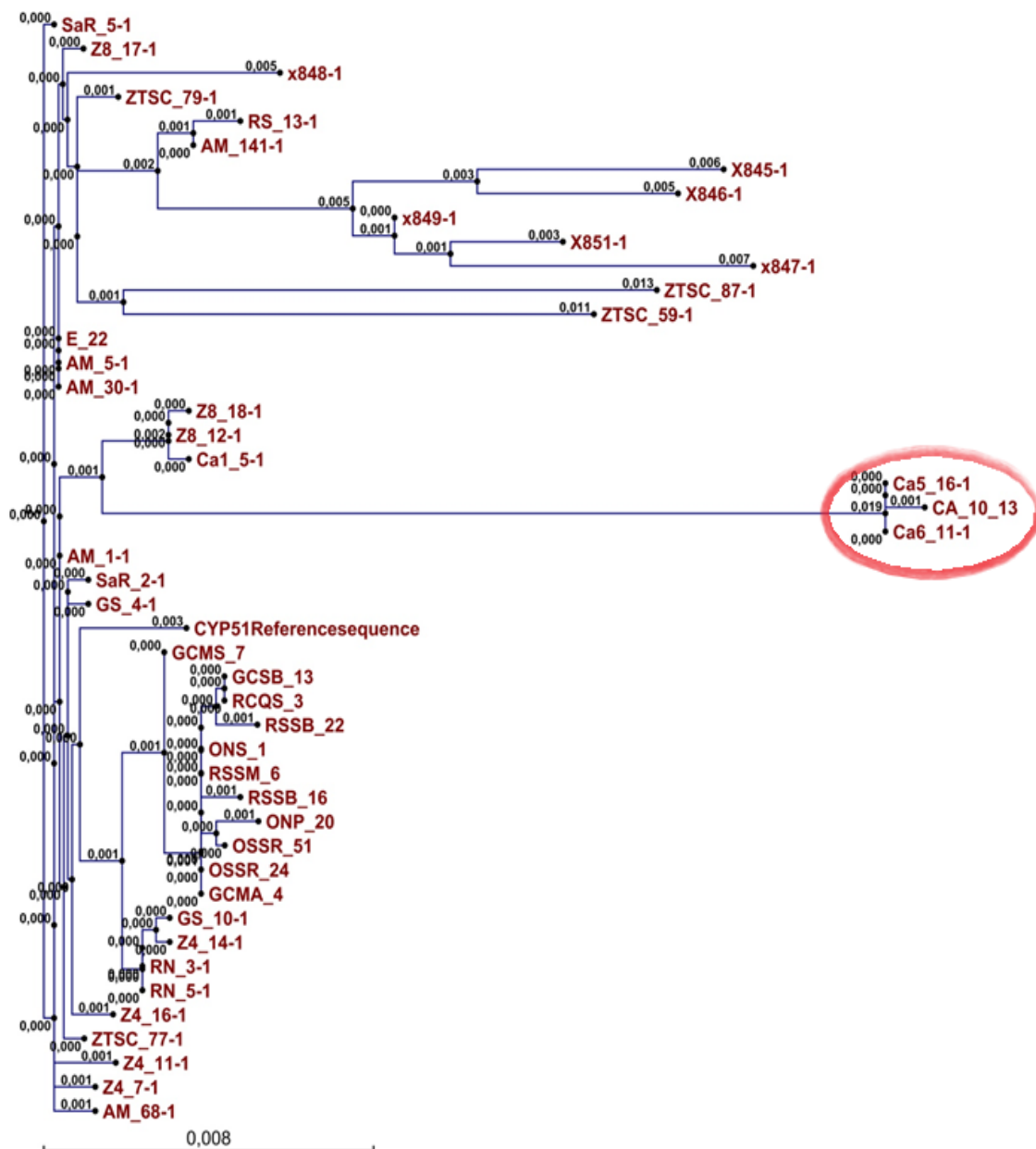
4.3. Análisis de Secuenciación

Una vez obtenida la secuencia de los aislados, se observó que dentro de la población de Ecuador existe una alta variación en la secuencia de nucleótidos para cada uno de los aislados en el gen *CYP51*. Se encontraron mutaciones dentro de las secuencias que no

podieron ser relacionadas con la resistencia ya sea parcial o total hacia cualquiera de los fungicidas Triazoles tratados en este trabajo, debido a que dichas mutaciones (F18T y D106V) se encontraban tanto en las secuencias de aislados como resistentes, tolerantes o susceptibles (Tabla XIV).

FIGURA 10

Árbol basado en la secuencia de Nucleótidos para el gen CYP51



En el análisis de secuenciación se realizó una comparación entre las secuencias de los nucleótidos de los aislados de Ecuador con los aislados considerados como cepas referencias, y secuencias de la base de datos de la web, donde la población de Ecuador se encontró muy cercana a la secuencia referencia para *CYP51*, agrupadas de manera alejada a otras secuencias de diferentes países, con excepción de aislados de Esmeraldas (E-22), agrupada con secuencias de la Amazonía de Brasil y Guayas (GS_4-1) y Los Ríos (SaR_2-1) dentro de otro grupo con características similares a secuencia de Amazonía de Brasil (Información adquirida del CIBE) (FIGURA 10). Dentro del círculo resaltado se puede observar poblaciones de Costa Rica, que en pruebas de sensibilidad mostraron una alta resistencia hacia los fungidas que han sido evaluados.

Para determinar la importancia de estas variaciones moleculares en la información nucleotídica del gen para la proteína, se realizó una traducción de la secuencia generando un información sobre los lugares de mutación importante para la producción de la proteína (FIGURA 11) los cambios relevante y posiciones que son necesarios para la conformación de esta proteína se encuentran marcados, (G313A, D461Y, D463Y, H463Y, N463Y, S463Y), en tres aislados en

el sector del Guayas (GCMS-7, GCMA4, GCSB-13), dos aislados del sector de El Oro (ONP-20, OSSR-24) y cuatro aislados del sector de Los Ríos (RCQS-3, RSSB-16, RSSM-6, RSSB-22), para la población de Ecuador seleccionada para la secuenciación, donde en comparación con las pruebas de sensibilidad muestran una resistencia parcial o total a los compuestos estudiados, descritos de manera completa en la Tabla XIV.

Tabla XIV
Mutaciones de Aislados Secuenciados

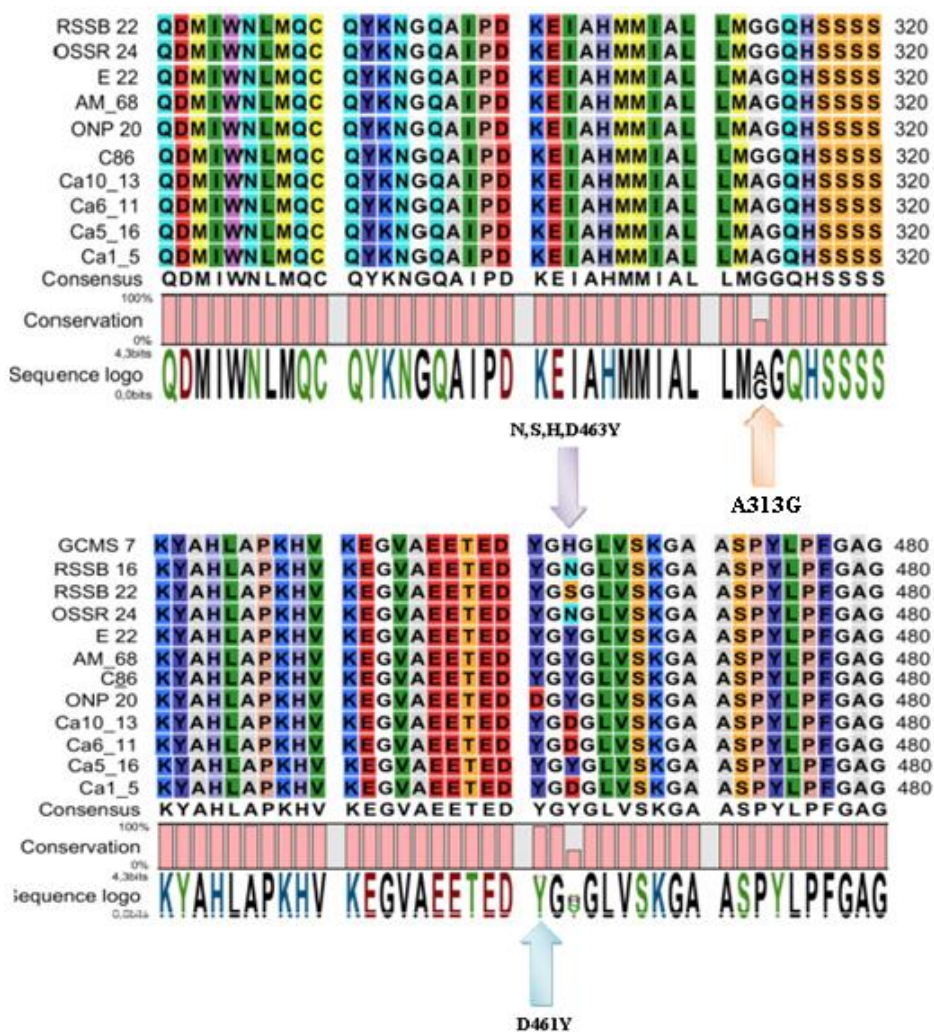
Códigos	Epoxiconazole (LC-50)	Propiconazole (LC-50)	Mutaciones					
C-86	S (0,03)	S (0,04)						
Ca10_13	R (8,75)	R (6,73)	I18 T	D106 V	Y136 F			D463 Y
Ca5_16	R (20,68)	R (12,06)	I18 T	D106 V	Y136 F			
Ca6_11	T (0,20)	R (1,52)	I18 T	D106 V	Y136 F			D463 Y
E_22	S (0,02)	S (0,03)	I18 T	D106 V				
EC1	T (0,90)	T (0,42)		D106 V				
EC5	R (2,35)	R (89,93)		D106 V				
ENB1	S (0,04)	S (0,03)		D106 V				
ENB52	T (1,05)	R (34,44)		D106 V				
ENV9	S (0,03)	S (0,02)		D106 V				
GCMA4	T (0,55)	R (1,98)	I18 T	D106 V		G313 A		N463 Y
GCMS-7	T (0,17)	S (0,00)	I18 T	D106 V		G313 A		H463 Y

GCSB-13	T (0,37)	R (1,74)	I18 T	D106 V		G313 A		H463 Y
GSa13	S (0,10)	R (5,26)		D106 V		G313 A		N463 Y
GSB5	S (0,11)	T (0,72)		D106 V		G313 A		N463 Y
GSN1	T (0,28)	R (1,74)		D106 V		G313 A		N463 Y
ONM9	S (0,02)	S (0,03)		D106 V		G313 A		N463 Y
ONP-20	S (0,07)	R (1,99)	I18 T	D106 V		G313 A	D461 Y	
OSSR-24	S (0,04)	T (0,33)	I18 T	D106 V		G313 A		N463 Y
RSaB14	S (0,08)	R (1,40)		D106 V		G313 A		N463 Y
RSaB6	S (0,06)	S (0,04)		D106 V				
RSSB-16	T (0,41)	R (3,09)	I18 T	D106 V		G313 A		N463 Y
RSSB-22	S (0,02)	R (1,82)	I18 T	D106 V		G313 A		S463 Y
RSSM-6	T (0,18)	T (0,76)	I18 T	D106 V		G313 A		N463 Y

Al realizar un árbol genético sobre la secuenciación de aminoácidos que codifican para la proteína *CYP51*, se obtiene que los cambios que se observaron dentro de las secuencias ubican a la población de Ecuador junto con los aislados de otros países, que comparten características similares dentro de su secuencia.

FIGURA 11

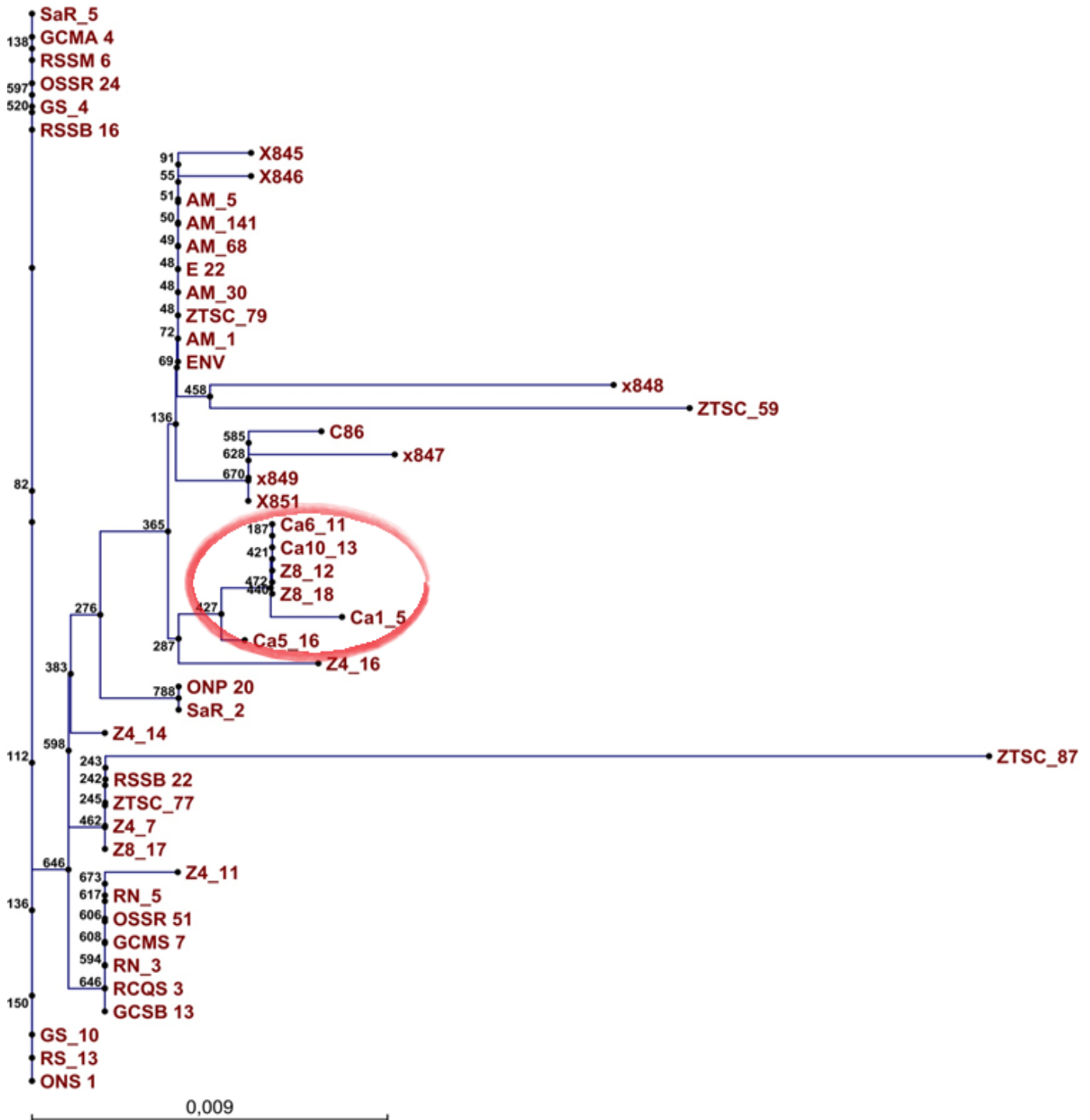
Mutaciones Encontradas en la Proteína CYP51



Donde las mutaciones que posiblemente se encuentran relacionadas con la resistencia, las cuales fueron determinadas en el trabajo (Anexo 4), ubican a la mayoría de la población de Ecuador dentro de grupos de aislados que comparten estas características, tanto de grado de Resistencia como de cambios en sus secuencias (figura 12).

FIGURA 12

Árbol Basado en los Aminoácidos que codifican para la proteína CYP51



CAPÍTULO 5

5.1 Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

1. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que no existe una resistencia cruzada dentro los fungicidas estudiados, lo que puede ser validado debido a sus diferentes estructuras químicas. A pesar de pertenecer al mismo grupo fúngico y tener la misma enzima objetivo su afinidad hacia esta es diferente para cada uno de los fungicidas químicos estudiados.
2. Dos loci (MfSSR350, Mfsc13_1) no demostraron ser eficientes para la caracterización de las poblaciones de *M. fijiensis*.
3. No existe una relación clara entre la pérdida de microsatélites con la ubicación del mismo en la secuencia del genoma de *M. fijiensis*.

4. Existen mutaciones que no precisan una reacción de resistencia ante los fungicidas (I18T, D106V).
5. De acuerdo a los resultados obtenidos, se identificó en los aislados de Ecuador la existencia de regiones mutantes (G313A, D461Y, D463Y, H463Y, N463Y y S463Y) que están relacionados con la resistencia de *M fijiensis* a Propiconazol.
6. Algunas de las mutaciones encontradas no parecen tener relación con la resistencia al Epoxiconazol. Es posible que otros mecanismos de resistencia estén involucrados en este caso.

Recomendaciones

1. Debido a las diferencias de resultados entre cepas consideradas como sensibles., tolerantes o resistentes y las características de la población, debería existir un estudio más amplio de la población de Ecuador.
2. De acuerdo a la inespecificidad de algunos primers no incluidos en los analice, podría ser de mayor utilidad generar más marcadores en la especie para el estudio de las poblaciones de la especie.
3. Debido a que el genoma de *M. fijiensis* se encuentra libre en la base de datos del Instituto de Secuenciación de Genomas (<http://genome.jgi-psf.org/Mycfi2/Mycfi2.home.html>), es importante identificar Para realizar la caracterización es importante obtener mayor cantidad de secuencia de los primers a ser usados y

determinar experimentalmente en el laboratorio cuales puedan ser más informativos, para la determinación de los genotipos en la especie.

4. Es importante al realizar tanto el aislamiento de las cepas, como las inoculaciones para las evaluaciones de sensibilidad, una gran asepsia al momento de trabajar, debido a que al no hacerlo se pueden llegar a contaminar y generar resultados falsos-positivos para los aislados evaluados.

Anexos

Anexo A

Descripción de Estadíos de 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.
--	--

Anexo B

Descripción de Aislados

Procedencia	Sector	Nombre de aislados	Coordenadas
Brasil	Amazonía	AM 68	N/A
África	Camerún	C-86	N/A
Costa Rica	N/A	Ca1_5	N/A
Costa Rica	N/A	Ca10_13	N/A
Costa Rica	N/A	Ca5_16	N/A
Costa Rica	N/A	Ca6_11	N/A
Ecuador-Esmeraldas	Centro	EC-1	N00° 55' 24.1'' W079° 40' 38.1''
Ecuador-Esmeraldas	Centro	EC-5	N00° 55' 24.1'' W079° 40' 38.1''
Ecuador-Esmeraldas	Centro	EC-17	N00° 55' 24.1'' W079° 40' 38.1''
Ecuador-Esmeraldas	Centro	ECM-1	N00° 10' 25.8''

			W079° 23' 41.2''
Ecuador-Esmeraldas	Centro	ECQ-31	N00°21' 15.4'' W07° 28' 24.6''
Ecuador-Esmeraldas	Centro	ECQ-9	N00°21' 15.4'' W07° 28' 24.6''
Ecuador-Esmeraldas	Norte	ENB-1	N01° 05' 04.4'' W079° 00' 37.7''
Ecuador-Esmeraldas	Norte	ENB-2	N01° 05' 04.4'' W079° 00' 37.7''
Ecuador-Esmeraldas	Norte	ENB-26	N01° 05' 04.4'' W079° 00' 37.7''
Ecuador-Esmeraldas	Norte	ENB-27	N01° 05' 04.4'' W079° 00' 37.7''
Ecuador-Esmeraldas	Norte	ENB-30	N01° 05' 04.4'' W079° 00' 37.7''
Ecuador-Esmeraldas	Norte	ENB-52	N01° 05' 04.4'' W079° 00' 37.7''
Ecuador-Esmeraldas	Norte	ENV-5	N01° 03' 29.2'' W079° 55' 42.6''
Ecuador-Esmeraldas	Norte	ENV-9	N01° 03' 29.2'' W079° 55' 42.6''
Ecuador-Esmeraldas	Sur	ESS-4	N00° 38' 27.3'' W079° 00' 37.7''
Ecuador-Guayas	Centro	GCB-15	S02° 00' 09.3'' W079° 28' 45.8''
Ecuador-Guayas	Centro	GCB-30	S02° 00' 09.3''

			W079° 28' 45.8''
Ecuador-Guayas	Centro	GCLg-18	S02° 05' 25.2''
			W079° 26' 29.9''
Ecuador-Guayas	Centro	GCLg-21	S02° 05' 25.2''
			W079° 26' 29.9''
Ecuador-Guayas	Centro	GCMA-4	S02° 05' 40.1''
			W079° 29' 45.5''
Ecuador-Guayas	Centro	GCMS-7	S02° 06' 4.38''
			W079° 31' 24.5''
Ecuador-Guayas	Centro	GCSA-4	S02° 05' 40.2''
			W079° 20' 10.5''
Ecuador-Guayas	Centro	GCSB-13	S02° 00' 15.7''
			W079° 28' 39.3''
Ecuador-Guayas	Silvestre	Gsa-13	S02° 04' 029''
			W079° 26' 10.4''
Ecuador-Guayas	Silvestre	Gsa-6	S02° 04' 029''
			W079° 26' 10.4''
Ecuador-Guayas	Sur	GSB-2	S02° 54' 44.2''
			W079° 44' 35.1''
Ecuador-Guayas	Sur	GSB-5	S02° 54' 44.2''
			W079° 44' 35.1''
Ecuador-Guayas	Sur	GSB-6	S02° 54' 44.2''
			W079° 44' 35.1''
Ecuador-Guayas	Sur	GSN-1	S02° 37' 42.6''
			W079° 37' 32.8''
Ecuador-Guayas	Sur	GSN-19	S02° 37' 42.6''

			W079° 37' 32.8''
Ecuador-El Oro	Centro	OCM-54	S03°15'15.3'' W079°26'10.4''
Ecuador-El Oro	Centro	OCP-1	S03°15'15.3'' W079°26'10.4''
Ecuador-El Oro	Norte	ONM-3	S03° 11' 41.9'' W079° 47'02.2''
Ecuador-El Oro	Norte	ONM-9	S03° 11' 41.9'' W079° 47'02.2''
Ecuador-El Oro	Norte	ONM-26	S03° 08' 55.6.9'' W079° 47'02.2''
Ecuador-El Oro	Norte	ONP-20	S03° 08'53.8'' W079°46'49.9''
		ONS 16	S03° 08'55.6'' W079°46'49.9''
Ecuador-El Oro	Silvestre	ONS-39	S03° 08'55.6'' W079°46'49.9''
Ecuador-El Oro	Silvestre	ONS-4	S03° 08'55.6'' W079°46'49.9''
Ecuador-El Oro	Silvestre	ONS-59	S03° 08'55.6'' W079°46'49.9''
Ecuador-El Oro	Silvestre	Osa-28	S03° 06' 57.9'' W079° 46'22.2''
Ecuador-El Oro	Sur	OSSR-13	S03° 25'46.7'' W079° 36' 42.9''

Ecuador-El Oro	Sur	OSSR-24	S03° 25' 46.7'' W079° 36' 42.9''
Ecuador-El Oro	Sur	OSSR-35	S03° 25' 46.7'' W079° 36' 42.9''
Ecuador-El Oro	Sur	OSSR-36	S03° 25' 46.7'' W079° 36' 42.9''
Ecuador-Los Ríos	Centro	RCQS-17	S00° 59' 19.8'' W079° 29' 32.02''
Ecuador-Los Ríos	Centro	RCQS-20	S00° 59' 19.8'' W079° 29' 32.02''
Ecuador-Los Ríos	Centro	RCQS-21	S00° 59' 19.8'' W079° 29' 32.02''
Ecuador-Los Ríos	Centro	RCQS-35	S00° 59' 19.8'' W079° 29' 32.02''
Ecuador-Los Ríos	Centro	RCQS-61	S00° 59' 19.8'' W079° 29' 32.02''
Ecuador-Los Ríos	Silvestre	RSaB-11	N00° 40' 25.6'' W079° 27' 18.8''
Ecuador-Los Ríos	Silvestre	RSaB-14	N00° 40' 25.6'' W079° 27' 18.8''
Ecuador-Los Ríos	Silvestre	RSaB-16	N00° 40' 25.6'' W079° 27' 18.8''
Ecuador-Los Ríos	Silvestre	RSaB-20	N00° 40' 25.6'' W079° 27' 18.8''
Ecuador-Los Ríos	Silvestre	RSaB-6	N00° 40' 25.6'' W079° 27' 18.8''

Ecuador-Los Ríos	Sur	RSP-5	S01° 37'41.7'' W079° 33'44.2''
Ecuador-Los Ríos	Sur	RSSB-16	S01° 32'04.9'' W079° 46'55.2''
Ecuador-Los Ríos	Sur	RSSB-22	S01° 32'04.9'' W079° 46'55.2''
Ecuador-Los Ríos	Sur	RSSB-38	S01° 32'04.9'' W079° 46'55.2''
Ecuador-Los Ríos	Sur	RSSM-6	S09°28'29.8'' W079° 44'31.8''

Anexo C

Protocolo de Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis*

a) Recolección de la muestra infectada en campo (hojas de banano con manchas características de la enfermedad en estadio 6 de desarrollo).
b) Los pedazos de hoja son recortados aproximadamente de 2cm ² del área previa de identificación de los pseudotesios conteniendo las ascosporas.
c) Los pedazos de hoja serán grapados con la cara inferior (envés) hacia afuera en papel filtro previamente recortado con un diámetro ligeramente superior al de la tapa de una caja petri.
d) Se construye una cámara húmeda utilizando un envase hermético que

contendrá en su interior algodón húmedo con agua destilada y las hojas grapadas en el papel filtro.
e) Se incuba la muestra durante 48 horas, luego se procede a la descarga.
f) Se colocan los papeles filtro con los pedazos de hoja en una placa o caja petri, frente a un medio conteniendo Agar agua únicamente.
g) Las hojas descargaran por el lapso de 2 horas las ascosporas sobre el medio, luego del cual se desechan los papeles con las hojas de banano.
h) En un ambiente estéril se lleva la placa al microscopio estéreo y se recolectan las ascosporas con una aguja, colocándolas en una placa de medio PDA.
i) 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).
j) Se colocan los medios inoculados en una zaranda a 120RPM durante 15-30Días.
k) El micelio del hongo es filtrado en un papel filtro estéril, se lava con agua destilada tibia 30-40°C y es secado a 50°C durante 48 horas.

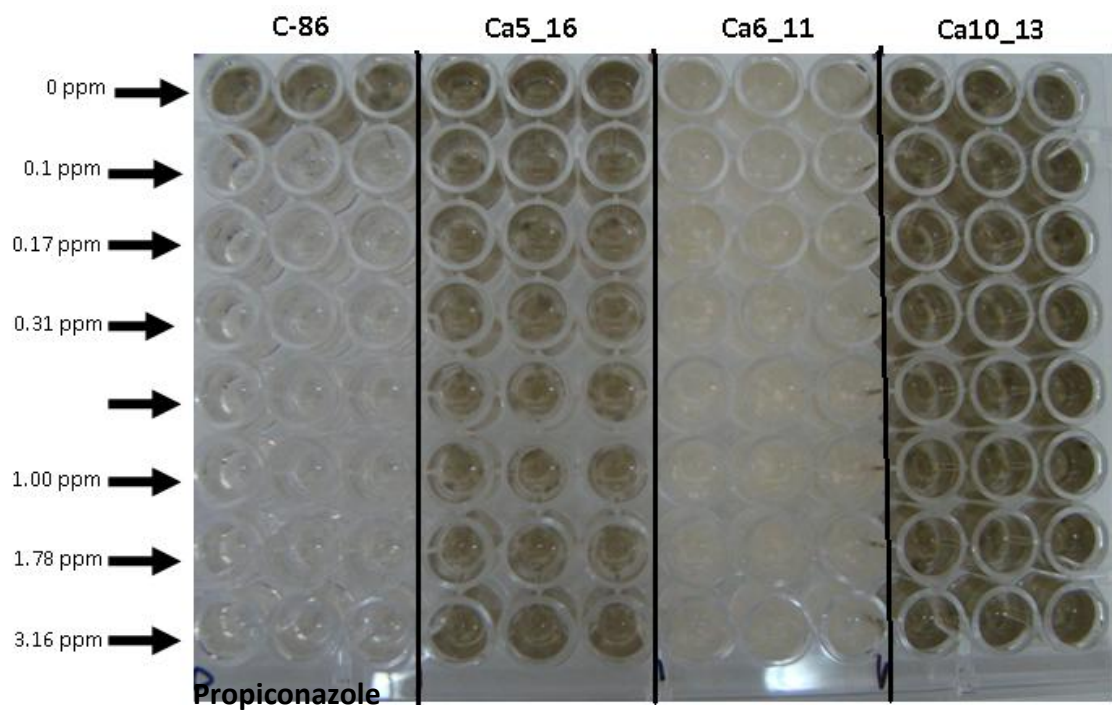
Anexo D

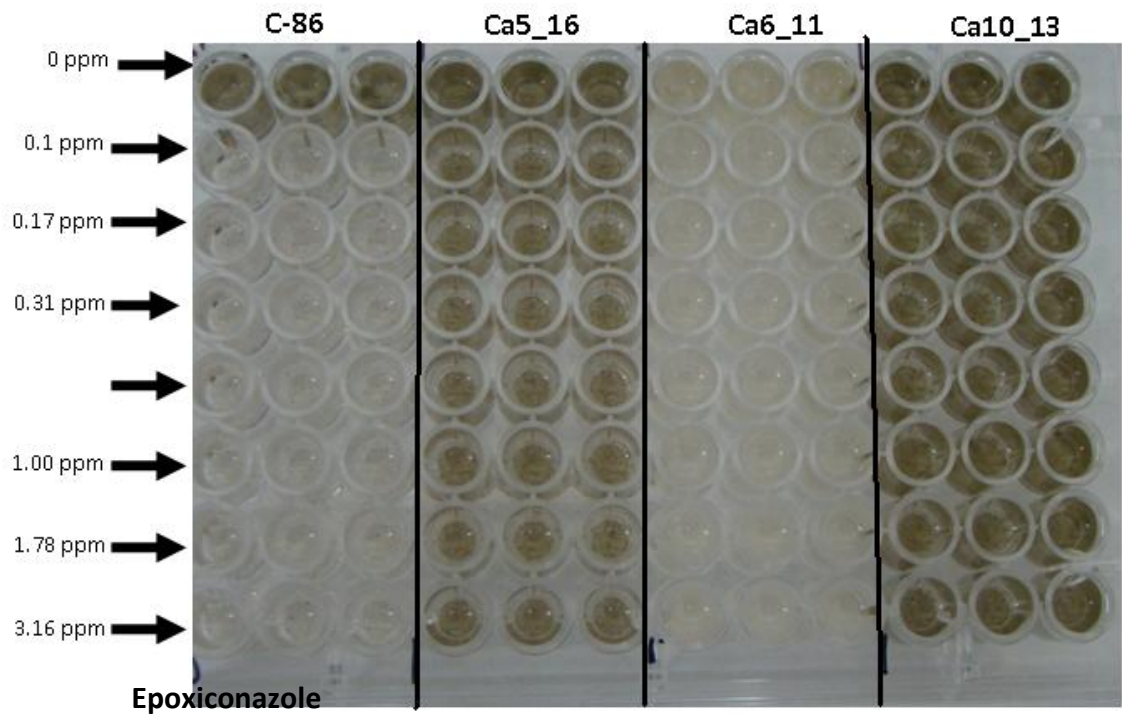
Información de LC-50 de Todos los aislados estudiados

Código de aislado	Epoxiconazole	Epoxiconazole	Propiconazole	Propiconazole
AM 68	0,03	S	0,04	S
C-86	0,03	S	0,04	S
Ca1_5	0,27	T	7,64	R
Ca10_13	8,75	R	6,73	R
Ca5-16	20,68	R	12,06	R
Ca6_11	0,20	T	1,52	R
EC 1	0,90	T	0,42	T
EC 5	2,35	R	89,93	R
EC_17	0,03	S	0,03	S
ECM 1	0,37	T	2,10	R
ECQ 31	0,04	S	0,10	T
ECQ 9	0,02	S	0,03	S
ENB 1	0,04	S	0,03	S
ENB 2	0,02	S	0,01	S
ENB 26	0,02	S	0,02	S
ENB 27	0,04	S	0,07	S
ENB 30	0,03	S	0,03	S
ENB 52	1,05	T	34,44	R
ENV 5	0,03	S	0,02	S

ENV 9	0,03	S	0,02	S
ESS 4	0,02	S	0,02	S
GCB 15	0,04	S	0,52	T
GCB 30	0,09	S	0,50	T
GCLg 18	0,52	T	1,77	R
GCLg 21	0,20	T	0,98	T
GCMA 4	0,55	T	1,98	R
GCMS 7	0,17	T	0,00	S
GCSA 4	27767,43	R	4,89	R
GCSB 13	0,37	T	1,74	R
Gsa 13	0,10	S	5,26	R
Gsa 6	0,29	T	1,39	R
GSB 2	0,25	T	0,57	T
GSB 5	0,11	S	0,72	T
GSB 6	3,59	R	0,23	T
GSN 1	0,28	T	1,74	R
GSN 19	0,04	S	0,48	T
OCM 54	0,09	S	0,96	T
OCP 1	0,05	S	0,55	T
ONM 26	0,25	T	1,00	R
ONM 3	0,02	S	0,03	S
ONM 9	0,02	S	0,03	S
ONP 20	0,07	S	1,99	R
ONS 16	0,06	S	1,67	R
ONS 39	0,25	T	0,94	T
ONS 4	0,02	S	3,62	R

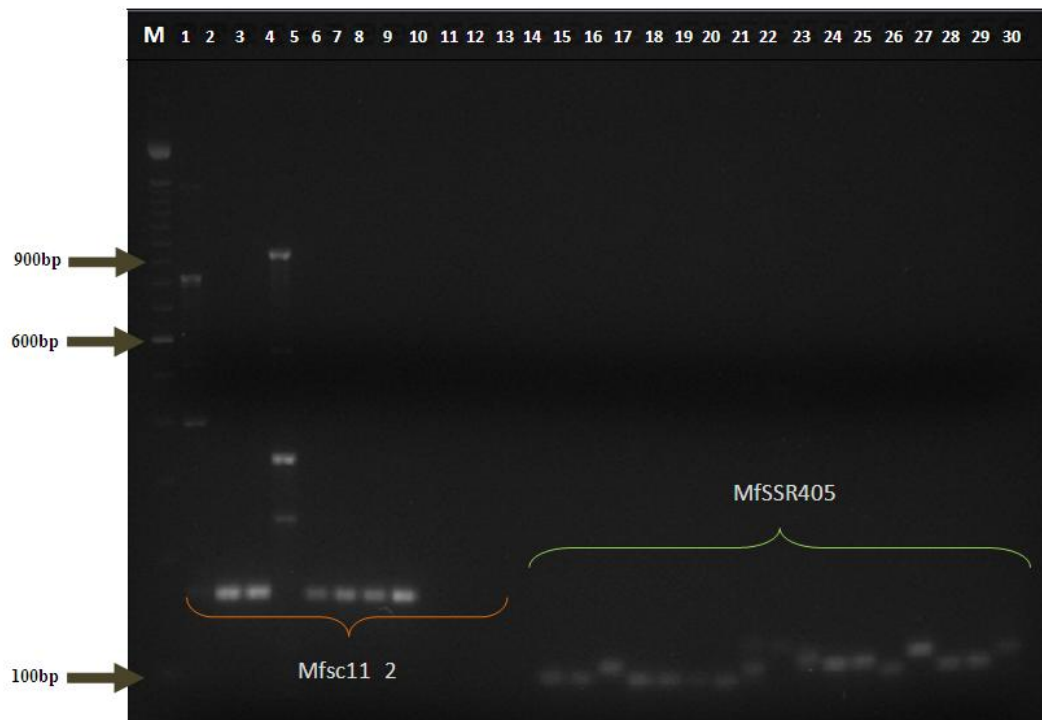
ONS 59	0,05	S	0,67	T
Osa 28	0,07	S	1,42	R
OSSR 13	0,04	S	0,33	T
OSSR 24	0,04	S	0,33	T
OSSR 35	0,20	T	1,98	R
OSSR 36	0,19	T	1,94	R
RCQS 17	0,10	T	1,06	R
RCQS 20	0,14	T	0,38	T
RCQS 21	0,09	S	0,36	T
RCQS 35	0,05	S	0,27	T
RCQS 61	0,34	T	1,15	R
RSaB 11	0,01	S	0,01	S
RSaB 14	0,08	S	1,40	R
RSaB 16	0,50	T	6,32	R
RSaB 20	0,06	S	0,25	T
RSaB 6	0,06	S	0,04	S
RSP 5	0,17	T	0,94	T
RSSB 16	0,41	T	3,09	R
RSSB 22	0,03	S	1,82	R
RSSB 38	0,18	T	2,92	R
RSSM 6	0,18	T	0,76	T

Anexo E**Fotografía de Crecimiento en Análisis de Sensibilidad hacia Propiconazole**

Anexo F**Fotografía de Crecimiento en Análisis de Sensibilidad hacia Epoxiconazole**

Anexo G

Imágenes de PCR con Primers Microsatélites



#	Código	#	Código	Mfsc11_2	#	Código	#	Código	#	Código	MfSSR405
1	ONS 42	7	OSSR 27		1	ONS 59	1	RCM 23	2	OSSR 36	
2	ONM 26	8	RSP 5		1	GSB 2	1	GCLg 21	2	ESS-4	
3	RSaB 16	9	RSaB 20		1	RSaB 11	2	ONS 42	2	OSSR 27	
4	GCB 13	10	GCLg 22		1	OCP 1	2	ONM 26	2	RSP 5	
5	OSSR 36	11	OSa 28		1	RSSB 37	2	RSaB 16	2	GCLg 14	
6	ESS-4				1	OCM 54	2	GCB 3	2	RSaB 20	

Anexo H

Tablas de Datos obtenidos de la medición de pares de base de los fragmentos de ADN amplificados

Información sobre aislados determinados como Cepas Referencias

Aislado/Locus	Mf SS R0 05	Mf SS R0 25	Mf SS R3 50	Mf SS R4 28	Mf SS R1 75	Mf SS R2 03	VN TR_ 133 3	Mf SS R2 44	MfS SR3 55_ 1	Mf SS R4 03	Mf sc 11 2	Mf SS R4 05	Mf sc 13 1	Mf SS R3 23	Mf SS R4 12
AM 68	83	93	0	0	220	0	344	200	140	156	16	0	43	220	172
C-86	148	176	0	136	220	227	194	210	150	196	16	116	0	220	172
Ca1_5	148	158	0	0	286	227	145	165	150	156	16	116	22	220	172
Ca1_0_13	148	158	0	0	220	240	260	210	150	140	0	116	40	220	172
Ca5_16	148	158	0	140	220	227	145	210	140	156	16	116	40	0	172
Ca6_11	148	158	0	0	220	240	260	160	150	164	16	116	40	0	172

Aislado/Locus	Mf sc 16 1	Mf SS R5 2	Mf sc 18 3	Mf sc 19 2	Mf sc 20 2	Mf SS R6 2	Mf sc 22 2	Mf sc 22 3	Mf sc 22 4	Mf sc 24 1	Mf sc 24 2	Mf sc 25 1	VNT R_3 786	VNT R_3 831	VNT R_3 959
AM 68	0	22	0	42	22	20	22	12	16	12	40	47	200	370	250
C-86	20	22	39	42	0	23	22	12	24	12	0	47	280	190	242
Ca1_5	0	20	0	42	0	20	22	12	45	12	0	47	200	0	220
Ca10_13	0	20	13	42	0	20	22	12	48	12	0	47	200	0	220
Ca5_16	0	20	13	42	0	20	22	12	48	12	27	47	200	190	220
Ca6_11	20	20	39	42	0	20	22	12	42	12	0	47	280	0	220

Información sobre aislados de la Población de Esmeraldas

Aislado/Locus	Mf SS R0 05	Mf SS R0 25	Mf SS R3 50	Mf SS R4 28	Mf SS R1 75	Mf SS R2 03	VN TR_ 133 3	Mf SS R2 44	MfS SR3 55_ 1	Mf SS R4 03	Mf sc 11 2	Mf SS R4 05	Mf sc 13 1	Mf SS R3 23	Mf SS R4 12
EC-5	173	176	0	0	260	240	190	160	150	164	16	116	57	0	172
EC-17	173	176	0	0	220	227	200	160	140	164	16	116	47	220	172
ECM 1	148	176	0	0	220	227	194	160	150	164	16	116	47	220	172

ECQ 31	173	176	0	0	220	227	200	200	150	196	16	116	47	220	172
											0		0		
ECQ 9	173	176	0	0	220	227	194	190	150	196	16	116	43	220	160
											0		0		
ENB 1	148	176	0	0	220	227	194	160	150	196	16	116	47	220	160
											0		0		
ENB 2	148	176	0	0	220	227	200	190	140	164	16	116	43	220	160
											0		0		
ENB 26	148	176	0	0	220	227	194	190	140	196	16	116	47	220	172
											0		0		
ENB 27	148	176	0	0	220	227	194	190	140	196	16	116	47	220	160
											0		0		
ENB 30	173	176	0	0	220	227	190	170	140	196	16	116	47	220	172
											0		0		
ENB 52	173	176	0	0	260	240	190	145	150	196	16	116	47	220	0
											0		0		
ENV 5	148	176	0	136	286	240	145	190	150	196	16	116	47	220	160
											0		0		
ENV 9	173	176	0	0	220	227	190	170	150	0	16	116	14	220	160
											0		5		
ESS 4	148	176	0	0	220	227	194	165	140	164	16	116	0	220	172
											0		0		

Aisla do/Locus	Mf sc 16	Mf SS R5 2	Mf sc 18 3	Mf sc 19 2	Mf sc 20 2	Mf SS R6 2	Mf sc 22 2	Mf sc 22 3	Mf sc 22 4	Mf sc 24 1	Mf sc 24 2	Mf sc 25 1	VNT R_3 786	VNT R_3 831	VNT R_3 959
EC-5	20	22	0	0	22	20	22	38	20	12	40	47	200	280	220
	0	0			2	0	9	0	0	0	0	9			
EC-17	0	22	0	0	0	20	22	54	42	12	27	47	200	190	0
		0				0	9	0	5	0	0	9			
ECM 1	0	22	0	0	22	20	22	38	20	12	40	47	200	0	234
		0			2	0	9	0	0	0	0	9			
ECQ 31	0	22	13	0	22	20	22	38	20	12	0	47	200	0	234
		0	0		2	0	9	0	0	0		9			
ECQ 9	20	20	0	0	0	20	22	54	22	12	0	47	200	0	265
	0	0				0	9	0	0	0		9			
ENB 1	0	22	13	0	22	20	22	54	22	12	0	47	200	0	220
		0	0		2	0	9	0	0	0		9			
ENB 2	0	22	26	0	22	20	22	54	22	12	40	47	200	250	220
		0	0		2	0	9	0	0	0	0	9			
ENB 26	0	20	0	0	22	20	22	54	22	12	0	47	200	190	220
		0			2	0	9	0	0	0		9			
ENB 27	20	22	0	0	22	20	22	54	20	12	0	47	200	190	220
	0	0			2	0	9	0	0	0		9			
ENB 30	0	20	0	0	22	20	22	54	22	12	0	47	200	0	220
		0			2	0	9	0	0	0		9			
ENB 52	0	0	0	42	22	20	22	54	20	12	0	47	200	190	220
				0	2	0	9	0	0	0		9			
ENV 5	0	22	26	42	22	20	22	54	26	12	12	47	200	260	234
		0	0	0	2	0	9	0	0	0	7	9			
ENV 9	0	22	0	42	22	20	22	26	22	12	0	47	200	190	250
		0		0	2	0	9	0	0	0		9			
ESS 4	23	0	0	42	22	20	22	54	45	12	25	47	280	190	220
	4			0	2	0	9	0	0	0	0	9			

Información sobre aislados de la Población del Guayas

Aislado/Locus	Mf SS R0 05	Mf SS R0 25	Mf SS R3 50	Mf SS R4 28	Mf SS R1 75	Mf SS R2 03	VN TR_133 3	Mf SS R2 44	MfS SR3 55_1	Mf SS R4 03	Mf sc 11_2	Mf SS R4 05	Mf sc 13_1	Mf SS R3 23	Mf SS R4 12
GCB 30	148	176	0	0	260	227	200	165	140	0	160	116	430	220	172
GCL g 18	178	176	0	0	220	227	190	160	150	0	0	116	430	220	172
GCL g 21	148	176	0	0	286	227	190	200	140	140	0	116	630	0	172
GCM A 4	148	176	0	0	220	240	194	164	150	0	160		550	220	172
GCM S 7	148	176	0	0	286	240	200	160	150	0	160	116	250	0	172
GCS A 4	148	176	0	136	286	240	194	200	150	156	323	116	550	0	172
GCS B 13	148	176	0	136	286	240	145	190	150	0	0	116	430	220	172
Gsa 13	148	176	0	0	260	240	194	190	150	156	0	116	145	220	172
Gsa 6	148	176	0	0	275	227	200	165	150	156	0	116	550	0	172
GSB 2	148	176	0	0	286	240	190	190	150	156	0	116	145	0	172
GSB 5	148	176	0	140	286	240	190	190	150	140	160	116	550	0	172
GSB 6	148	176	0	134	220	240	190	190	150	156	0	116	250	220	172
GSN 1	173	176	0	0	286	240	194	165	0	0	0	116	220	220	172
GSN 19	173	176	0	0	260	240	190	190	0	156	0	116	145	220	172

Aislado/Locus	Mf sc 16_1	Mf SS R5 2	Mf sc 18_3	Mf sc 19_2	Mf sc 20_2	Mf SS R6 2	Mf sc 22_2	Mf sc 22_3	Mf sc 22_4	Mf sc 24_1	Mf sc 24_2	Mf sc 25_1	VNT R_3 786	VNT R_3 831	VNT R_3 959
GCB 30	0	220	0	380	222	0	0	572	425	120	0	479	200	0	220
GCL g 18	0	220	0	420	0	0	229	572	480	120	270	479	300	0	0
GCL g 21	234	220	0	0	222	0	229	572	200	0	430	479	300	0	234
GCM A 4	0	220	0	0	222	200	0	380	480	120	0	479	200	0	234
GCM S 7	234	0	130	420	222	200	229	0	0	120	0	479	200	280	220

GCS A 4	23 4	22 0	13 0	0	22 2	23 1	22 9	38 0	48 0	12 0	20 2	47 9	200	260	0
GCS B 13	0	22 0	0	42 0	0	20 0	22 9	38 0	50 0	12 0	0	47 9	200	250	220
Gsa 13	0	20 0	0	0	0	23 1	22 9	54 0	50 0	12 0	20 2	47 9	200	400	234
Gsa 6	0	22 0	0	42 0	0	23 1	22 9	38 0	50 0	12 0	0	47 9	300	0	220
GSB 2	0	22 0	39 0	42 0	0	23 1	22 9	54 0	48 0	12 0	0	47 9	300	0	234
GSB 5	0	24 0	0	42 0	22 2	23 1	22 9	54 0	0	12 0	0	47 9	200	280	220
GSB 6	0	22 0	13 0	42 0	22 2	20 0	22 9	54 0	0	12 0	20 2	47 9	200	230	220
GSN 1	23 4	22 0	13 0	42 0	0	23 1	0	54 0	0	12 0	0	47 9	300	190	220
GSN 19	23 4	0	39 0	42 0	0	23 1	0	54 0	42 5	0	0	47 9	300	260	234

Información sobre aislados de la Población de El Oro

Aislado/ Locus	Mf SS R0 05	Mf SS R0 25	Mf SS R3 50	Mf SS R4 28	Mf SS R1 75	Mf SS R2 03	VN TR_ 133 3	Mf SS R2 44	MfS SR3 55_ 1	Mf SS R4 03	Mf sc 11 _2	Mf SS R4 05	Mf sc 13 _1	Mf SS R3 23	Mf SS R4 12
OCM 54	148	176	0	0	260	240	190	165	0	140	0	116	55 0	220	172
OCP 1	148	176	0	0	260	240	190	210	0	140	0	116	57 6	220	172
ONM 26	148	176	0	0	260	240	260	170	0	156	16 0	116	0	220	172
ONM 3	148	176	0	0	260	240	190	165	150	0	0	116	25 0	220	172
ONM 9	148	158	0	0	220	240	190	170	150	140	0	116	45 0	220	172
ONP 20	148	158	0	0	260	240	200	170	0	140	0	0	57 6	220	172
ONS 16	173	158	0	0	275	240	194	190	150	0	0	116	0	220	172
ONS 39	173	176	0	0	220	227	200	190	0	0	0	116	57 6	220	172
ONS 4	148	176	0	0	275	227	200	190	0	0	0	116	22 0	220	172
ONS 59	148	176	0	0	260	227	190	190	0	0	16 0	116	57 6	220	172
Osa 28	173	176	0	0	275	277	145	210	0	140	0	116	31 4	220	172
OSS R 13	148	0	0	0	275	277	200	165	0	0	0	116	55 0	220	0
OSS R 24	148	176	0	0	275	277	190	210	150	140	16 0	116	45 0	220	172
OSS R 35	173	176	0	0	220	277	190	190	0	156	16 0	116	0	220	160
OSS R 36	173	176	0	0	275	277	145	165	0	0	16 0	116	57 6	220	172

Aisla do/L ocus	Mf sc 16 _1	Mf SS R5 2	Mf sc 18 _3	Mf sc 19 _2	Mf sc 20 _2	Mf SS R6 2	Mf sc 22 _2	Mf sc 22 _3	Mf sc 22 _4	Mf sc 24 _1	Mf sc 24 _2	Mf sc 25 _1	VNT R_3 786	VNT R_3 831	VNT R_3 959
OCM 54	0	22 0	0	42 0	0	23 1	22 9	54 0	28 0	0	0	47 9	300	280	0
OCP 1	0	22 0	0	42 0	0	23 1	0	54 0	0	12 0	0	47 9	300	0	234
ONM 26	0	22 0	0	0	22 2	23 1	22 9	0	50 0	12 0	0	47 9	300	0	220
ONM 3	0	24 0	0	42 0	0	23 1	22 9	54 0	20 0	12 0	0	47 9	200	190	250
ONM 9	0	22 0	13 0	42 0	22 2	23 1	22 9	0	26 0	12 0	0	47 9	200	280	0
ONP 20	0	24 0	0	42 0	22 2	23 1	22 9	54 0	28 0	12 0	0	47 9	200	0	250
ONS 16	0	24 0	13 0	42 0	0	23 1	22 9	54 0	0	12 0	0	47 9	200	280	234
ONS 39	0	24 0	26 0	42 0	22 2	23 1	22 9	38 0	0	12 0	0	47 9	300	260	220
ONS 4	0	24 0	0	0	0	23 1	22 9	54 0	28 0	12 0	0	47 9	300	0	220
ONS 59	0	24 0	0	0	0	23 1	0	0	24 0	12 0	0	47 9	300	0	220
Osa 28	0	0	39 0	0	0	23 1	0	54 0	50 0	0	0	47 9	300	0	234
OSS R 13	0	0	0	0	0	0	22 9	54 0	50 0	0	0	47 9	0	0	220
OSS R 24	23 4	24 0	0	0	0	23 1	22 9	0	0	12 0	0	47 9	300	0	220
OSS R 35	0	0	0	0	0	0	22 9	54 0	0	12 0	0	47 9	0	0	0
OSS R 36	0	0	0	0	0	20 0	22 9	54 0	42 5	0	0	47 9	300	0	0

Información sobre aislados de la Población de Los Ríos

Aisl ado/ Loc us	Mf SS R0 05	Mf SS R0 25	Mf SS R3 50	Mf SS R4 28	Mf SS R1 75	Mf SS R2 03	VN TR_ 133 3	Mf SS R2 44	MfS SR3 55_ 1	Mf SS R4 03	Mf sc 11 _2	Mf SS R4 05	Mf sc 13 _1	Mf SS R3 23	Mf SS R4 12
RCQ S 17	148	0	0	0	286	277	185	170	0	140	0	116	57 6	0	172
RCQ S 20	148	176	0	0	275	277	185	165	0	0	16 0	0	45 0	220	172
RCQ S 21	148	176	0	0	275	240	185	170	0	164	0	116	57 6	220	172
RCQ S 35	148	176	0	0	275	240	185	170	0	0	16 0	116	45 0	220	172
RCQ S 61	148	176	0	0	275	227	185	165	0	0	0	116	43 0	220	172
RSa B 11	148	176	0	0	275	227	190	190	0	0	0	116	43 0	220	172
RSa	173	158	0	0	286	227	185	190	0	0	0	116	45	220	160

B 14													0		
RSa B 16	148	176	0	0	286	227	190	210	0	140	0	116	25 0	220	160
RSa B 20	148	176	0	0	286	227	185	210	0	164	16 0	116	55 0	220	160
RSa B 6	173	176	0	0	286	227	185	210	0	0	16 0	116	25 0	220	160
RSP 5	148	158	0	0	286	227	145	210	0	0	0	116		220	172
RSS B 16	148	176	0	0	220	227	194	190	150	140	16 0	116		220	172
RSS B 22	148	176	0	0	286	227	194	200	150	0	16 0	0	45 0	220	172
RSS B 38	148	176	0	148	275	240	190	190	150	140	16 0	116	22 0	220	172
RSS M 6	148	158	0	148	275	240	145	200	150	140	16 0	116		220	172

Aisla do/L ocus	Mf sc 16	Mf SS R5	Mf sc 18	Mf sc 19	Mf sc 20	Mf SS R6	Mf sc 22	Mf sc 22	Mf sc 22	Mf sc 24	Mf sc 24	Mf sc 25	VNT R_3 786	VNT R_3 831	VNT R_3 959
RCQ S 17	0	24 0	0	0	0	23 1	22 9	54 0	0	0	0	47 9	280	0	220
RCQ S 20	0	24 0	13 0	0	0	20 0	22 9	54 0	0	0	0	47 9	280	0	250
RCQ S 21	0	24 0	0	0	0	23 1	22 9	0	45 0	0	0	47 9	280	0	220
RCQ S 35	0	20 0	0	0	0	23 1	22 9	0	0	0	0	47 9	280	0	234
RCQ S 61	23 4	20 0	0	0	0	20 0	22 9	54 0	45 0	0	0	47 9	280	0	0
RSa B 11	0	20 0	0	0	0	20 0	22 9	54 0	0	0	0	47 9	280	0	250
RSa B 14	0	22 0	0	0	0	20 0	22 9	54 0	0	0	0	47 9	280	0	220
RSa B 16	0	20 0	0	0	0	20 0	0	54 0	0	0	0	47 9	200	0	220
RSa B 20	0	0	0	0	0	0	22 9	54 0	45 0	0	0	47 9	200	0	220
RSa B 6	0	22 0	0	0	0	20 0	22 9	0	0	0	0	47 9	0	250	250
RSP 5	0	22 0	26 0	0	0	23 1	22 9	54 0	0	0	0	47 9	200	260	220
RSS B 16	0	22 0	13 0	0	0	23 1	22 9	54 0	0	12 0	0	47 9	200	400	220
RSS B 22	0	22 0	0	0	0	20 0	22 9	0	0	12 0	0	47 9	200	250	234
RSS B 38	20 0	22 0	0	0	0	20 0	22 9	54 0	0	12 0	0	47 9	200	260	220
RSS M 6	20 0	0	0	0	0	23 1	22 9	54 0	0	12 0	0	47 9	200	190	0

Anexo I

Frecuencia de Todos los loci

Allele \ Locus	MfSSR00 5	MfSSR02 5	MfSSR42 8	MfSSR17 5	MfSSR20 3	VNTR_133 3	MfSSR24 4
Allele 1	0.6833	0.1034	0.5000	0.3167	0.4746	0.1000	0.0167
Allele 2	0.3167	0.8966	0.1250	0.2000	0.4068	0.1333	0.1000
Allele 3			0.3750	0.2333	0.1186	0.3333	0.0167
Allele 4				0.2500		0.2333	0.1833
Allele 5						0.1833	0.1333
Allele 6						0.0167	0.3500
Allele 7							0.0833
Allele 8							0.1167
Allele 9							

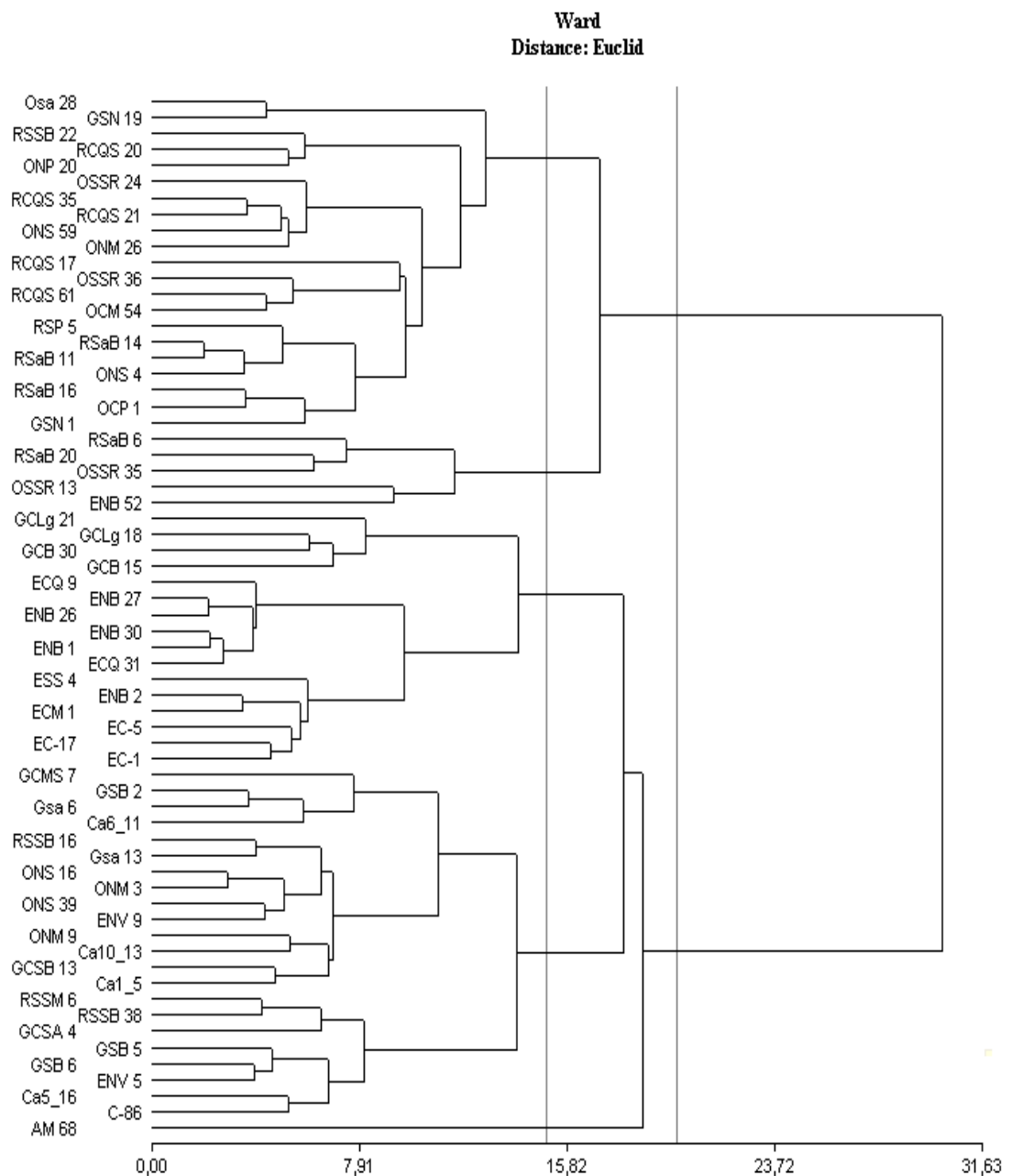
Allele \ Locus	MfSSR355 _	MfSSR40 3	Mfsc11_ 2	MfSSR40 5	MfSSR32 3	MfSSR41 2	Mfsc16_ 1
Allele 1	0.2500	0.3611	0.9412	1.0000	1.0000	0.1897	0.4000
Allele 2	0.7500	0.2222	0.0588			0.8103	0.6000
Allele 3		0.1944					
Allele 4		0.2222					
Allele 5							
Allele 6							
Allele 7							
Allele 8							
Allele 9							

Allele \ Locus	MfSSR5 2	Mfsc18_ 3	Mfsc19_ 2	Mfsc20_ 2	MfSSR6 2	Mfsc22_ 2	Mfsc22_ 3
Allele 1	0.1600	0.5882	0.0476	1.0000	0.5283	1.0000	
Allele 2	0.6200	0.2353	0.9524		0.4717		0.0196
Allele 3	0.2200	0.1765					0.0196
Allele 4							0.1569
Allele 5							0.7451
Allele 6							0.0588
Allele 7							
Allele 8							
Allele 9							

Allele \ Locus	Mfsc22_4	Mfsc24_1	Mfsc24_2	Mfsc25_1	VNTR_378_6	VNTR_383_1	VNTR_395_9
Allele 1	0.1795	1.0000	0.0769	10000	0.5789	0.3103	0.5918
Allele 2	0.1795		0.2308		0.1579	0.0345	0.2653
Allele 3	0.0256		0.0769		0.2632	0.1379	
Allele 4	0.0513		0.1538			0.2414	0.1224
Allele 5	0.0769		0.3846			0.2069	0.0204
Allele 6	0.1026		0.0769				
Allele 7	0.1026					0.0690	
Allele 8	0.1026						
Allele 9	0.1795						

Anexo J

Dendograma de Parentesco entre todos los individuos



Bibliografía

1. Aria, P., Dankers, C., Liu, C., Pilkaskas, P. (2004). La Economía Mundial Del Banano. *Food and Agriculture Organization (FAO)*, www.fao.org.ec.
2. Martínez, L. (2004). Trabajo Flexible en las Nuevas Zonas Bananeras del Ecuador. Red de Bibliotecas Virtuales de Ciencias Sociales de América Latina y el Caribe. *Red de Centros de Miembros de CLACSO*.
3. Stover, R., and Simmonds, N. (1987). Tropical Agriculture Series. *Longman Group UK*, 468.
4. Anonimo. (2010). *Fungicide Resistance Action Committee* . Obtenido de FRAC Cod List: www.frac.info
5. Anonimo. (2003). *Shaping the future. Geneva World Health Organization*. Genova-Italy: The World health report.

6. Grünwald, N., Goodwin, S., Milgroom, M., and Fry, W. (2003). Analysis of Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. *Blackwell Science Ltd., Phytopatology*, 738-746.
7. Ausina, V., Morena, S. (2005). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Medicina Panamericana*, 161.
8. Stämmler, G., Carstensen, M., Koch, A., Semar, M., Strobel, D., and Schlehuber, S. (2008). Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and –field efficacy. *Elsevier Ltd*, 1448-1456.
9. Caña, G., Angarita, M., Restrepo, J., Rodríguez, P., Moreno, C., and Arango, R. (2009). analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistance isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Society of Chemical Industry*, 892-899.
10. Zhan, J., Linde, C., Jürgens, T., Merz, U., Steinebrunner, F., McDonald, B. (2005). Variation for neutral markers is correlated with variation for quantitative traits in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology*, 14, 2683-2693.

11. Fraaije, B. C. (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. *Molecular Plant Pathology*, 245-254.
12. Hidalgo, A., Rodriguez, W., Serrano, E. (2006). Efecto De La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) Sobre La Fotosíntesis y Transpiración Foliar del Banano. *Agronomía Costarricense*, 35-41.
13. Churchill, A. (2011). *Mycosphaerella Fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 307-328.
14. Mobambo, K., Gauhl, F., Vuylsteke, D., Ortiz, R., Pastberg-Gauhi, C. and Swennen, R. (1993). Yield loss in plantain from Nlack Sigatoka leaf spot and Field performance of resistance hybrids. *Field Crops Research*, 35, 35-42.
15. Romero, R. R., and Sutton, T. B. (1998). Characterizatiom of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Disease*, 931-934.
16. Gasparotto, L., Pereira J. C., Urben, A., Hanada R. and Pereira M. C. (2005). Heliconia psittacorum: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*,

- agente causal da Sigatoka-negra da bananeira. *Fitopatol Bras*, 30, 423.-425.
17. Stover, R. H. (1978). Distribution and probable origin of *Mycosphaerella fijiensis* in southeast Asia. *Tropical Agriculture*, 65-68.
18. Deighton, F. C. (1976). Studies on Cercospora and allied genera. VI. Pseudocercospora Speg., Pantospora Cif. and Cercoseptoria Petr. *Myco. Pap.*, 1-168.
19. Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*, Amsterdam: Elsevier Academic.
20. Liberato, J. R., Peterson, R. A., Gasparotto, L., Ferrari, J. T., Grice, K., Porchun, S. C., and Shivas, R. G. (2009). Black sigatoka of banana (*Mycosphaerella fijiensis*). Available at Pest and Diseases Image Library, Species Content Page. *Plant Biosecurity Toolbox*, <http://www.padil.gov.au/viewPestDiagnosticImages.aspx?id=431>.
21. Anonimos. (8 de Febero de 2012). *Asociación de Exportadores Bananeros del Ecuador (AEBE)*. Obtenido de www.aebe.com.ec
22. Arzanlou, M., Aben, E., Kema G., Waalwijk, C., Carlier, J., De Vries, I., Guzman, M., and Crous P. . (2007). Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*, 1112-1118.
23. Carlier, J., Fouré, E., Gauhl, F., Jones, D. R., Lepoivre, P., Mourichon, X., Pasberg-Gauhl, C. and Romero, R. A. (2000). Black leaf streak. In:

- Diseases of Banana, Abacá and Enset. *New York: CABI Publishing*, 37-79.
24. Ploetz, R., Thomas, J., and Slabaugh W. (2003). Diseases of banana and plantain. In: *Diseases of Tropical Fruit Crops. MA: CABI Publishing*, 73-134.
25. Stover, R. H. (1980). Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease*, 750-756.
26. Henriques, W., Jeffers, R. D., Leacher, T. E., and Kendall, R. J. (1997). Agrochemical use on ecological risk. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 91-99.
27. Fullerton, R. A., and Tracey, G. M. (1984). Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazim in the pacific islands. *Tropical Agriculture*, |133-136.
28. Mejía, M., Cifuentes, L., Vélez, G., Gil, E., Molina, C., Molina, E., Molina, J., Stechauner, R., Ramírez, C., Tenorio, G., Sánchez, M., Mejía J., Jiménez, J., Marín, A., Ayala, A., Barragán, F., Acevedo, A., Tamayo, J., and Vescanve, G. (2001). *Agricultura Ecológica*. Bogotá-Colombia: Terranova Editores.
29. Castaño, J. (1986). *Principios Básicos de Fitopatología* (Vol. 93). Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.

30. Brent, K., and Hollomon, D. (2007). Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It Be Managed? *Fungicide Resistance Action Committee (FRAC)* (págs. 3-35). Brussell--Belgium: Monograph No.1.
31. Leroux, P., Gredt, M., Lerch, M., and Walker, A.S. (2010). Exploring Mechanisms of Resistance to Respiratory Inhibitors in Field Strains of *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Gray Mold. *Applied and Environmental Microbiology*, 6615-6630.
32. Brent, J., and Hollomon D. (2007). Fungicide resistance: the assessment of risk. *FRAC Monograph 2*, 1-28.
33. Luque, J., and Herráez, A. (2005). *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Córdoba: Harcourt.
34. Alijanabi, S., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692-4693.
35. Fendri, M. (2008). . Uso de marcadores microsatélites (SSRs) para el análisis de la variabilidad molecular y la identificación de variedades de olivo del banco de germoplasma de "Boughrara" (SFAX, Túnez). *Universidad de Córdoba*.
36. Beveraggi, A., Mourichon, X. And Salle, G. (1995). Etude Comparée des premières étapes de l'infection chez les bananieres sensibles et

résistants infectés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*), agent responsable de la maladie des raies noires. *Canadian journal of Botany*, 73, 1328-1337.

37. Chong, P. (2003) Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet Provenientes de Haciendas Bananeras con manejo Orgánico y Convencional. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, 4-44
38. Anónimo. (2012). Comunicación Personal (Rufino Mesa).
39. Anónimo. (2012). Comunicación Personal (Ms.C. Pablo Chong).
40. Romero, C. (2009). Análisis del Polimorfismo, Mediante el Uso de Marcadores SSRs, de Variación de *Musa* spp., Resistentes, Tolerantes o Susceptibles a la infección de *Mycosphaerella fijiensis*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. 4-27
41. Yang Bao, J., and Zhong B. S. (2008). Fourteen polymorphic microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology Resources*, 8, 910-912.
42. Zapater, M., Duchemin, M., Dussart, J., Coste, D., Brottier, B., And Carlier, J. (2008). Microsatellite markers for the fungal banana pathogens *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella eumusae*. *Molecular Ecology Resources*, 8, 1121-1125.

43. Robert, S., Rieux, A., Argout, X., Carlier, J., Zapater, M.F. (2010). 2. Optimized Genotyping With Microsatellite Markers In The Fungal Banana Pathogen *Mycosphaerella fijiensis* (MYCOSPHAERELLACEAE). *American Journal of Botany*, e130-e132.
44. Neu, C., Kaemmer, D., Kahl, G., Fischer, D., and Weising, K. (1999). Polymorphic microsatellite markers for banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 8, 523-525.
45. Meredith, D., 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, 476-559.
46. Jacome L., Lepoivre P., Marin D., Ortiz R., Romero R., Escalant J. V. (2003). The spread, detection and impacta of black leaf streak disease and other *Mycosphaerella* species in the 1990s. En R. R. A. (Ed.), *Mycosphaerella lea diseases of bananas: prsent setatus and outlook. PProceedings of the 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseas held in San José, Costa Rica* (págs. 21 - 47). Roma: INIBAP.
47. Llácer, G., López, M., Trapero, A., Bello, A. (2000). *Patología Vegetal*. Barcelona-España: M.V Phtoma-España S. L.

48. Ablan, M., Anderssen, R., Bracho, T., Casnova, E., Nuñez, L. (2000). *Sistema de información Bioclimática del Lago de Maracaibo. Pronóstico de plagas y estudio de Chubascos*. Maracaibo-Venezuela: Informe de Labores de Cecalculta.
49. Garcia, S., Vander Lee, T., Ferreira, C., Te Lintel Hekkert, B., Zapater, M., Goodwin, S., Guzmán, M., Kema, G., and Souza Jr., M. (2010). Variable number of tandem repeat markers in the genome sequence of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana (*Musa* spp). *Genetics And Molecular Research*, 9(4), 2207-2212.
50. Anónimos. (s.f.). Review of the world market situation for bananas and tropical fruits. *Joint Meeting of the 4th Session of the Sub-Group on Bananas and the 5th Session of the Sub-Group on Tropical Fruits, Committee on Commodity Problems. Rome* (págs. Joint Meeting of the 4th Session of the Sub-Group on Bananas and the 5th Session of the Sub-Group on Tropical Fruits, Committee on Commodity Problems. Rome). Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations.