



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la  
Producción**

“Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis*  
*Morelet* Provenientes de Haciendas Bananeras con Manejo  
Orgánico y Convencional”

**TESIS DE GRADO**

Previa la obtención del Grado de:

**MAGISTER EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

Presentada por:

**Pablo Antonio Chong Aguirre**

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**Año: 2007**

## ÍNDICE GENERAL

|                        |     |
|------------------------|-----|
| RESUMEN.....           | I   |
| INDICE DE FIGURAS..... | II  |
| INDICE DE TABLAS.....  | III |
| ABREVIATURAS.....      | IV  |
| INTRODUCCIÓN.....      | V   |

### CAPITULO 1

|   |    |
|---|----|
| 1. MECANISMOS DE LA SELECCIÓN NATURAL.....                    | 4  |
| 1.1 La dinámica genética de las poblaciones en evolución..... | 5  |
| 1.1.1 Ecología de las poblaciones.....                        | 5  |
| 1.1.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....                       | 6  |
| 1.1.3 Procesos de Mutación.....                               | 8  |
| 1.1.3.1 Orígenes de la resistencia.....                       | 9  |
| 1.1.4 Flujo genético.....                                     | 11 |
| 1.1.5 La deriva genética.....                                 | 14 |
| 1.1.5.1 Efecto fundador.....                                  | 16 |
| 1.2 Selección sexual.....                                     | 18 |
| 1.2.1 Heterocigosidad.....                                    | 21 |

### CAPITULO 2

|  |    |
|--|----|
| 2. DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL.....     | 23 |
| 2.1 Estructura de las poblaciones..... | 23 |

CAPITULO 3

|   |    |
|---|----|
| 3. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....                                  | 25 |
| 3.1 Origen y Distribución de la Sigatoka Negra.....                   | 25 |
| 3.2 Biología de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....                 | 28 |
| 3.2.1 Taxonomía y Morfología.....                                     | 30 |
| 3.2.2 Mecanismos de dispersión de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ... | 32 |
| 3.2.3 Ciclo de Vida.....  | 33 |
| 3.2.3.1 Reproducción de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....         | 33 |
| 3.2.3.2 Epidemiología de la enfermedad.....                           | 36 |
| 3.2.3.3 Control de la enfermedad.....                                 | 39 |
| 3.2.3.3.1 Control químico.....  | 39 |
| 3.2.3.3.2 Prácticas y Control orgánico.....                           | 40 |
| 3.2.4 Variabilidad patogénica.....                                    | 42 |
| 3.2.5 Diversidad genética de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....    | 44 |

CAPITULO 4

|                        |    |
|------------------------|----|
| 4. MICROSATÉLITES..... | 46 |
|------------------------|----|

CAPITULO 5





|   |    |
|---|----|
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                      | 49 |
| 5.1 Situación Geográfica y climática de la zona.....              | 49 |
| 5.2 Muestreo.....   | 53 |
| 5.3 Protocolo de Cultivo de <i>Mycosphaerella Fijiensis</i> ..... | 54 |
| 5.4 Medios de cultivo.....  | 56 |
| 5.5 Protocolo de extracción de DNA.....                           | 57 |
| 5.6 Soluciones.....   | 58 |
| 5.7 Protocolo de PCR.....   | 61 |

## CAPITULO 6

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 63 |
|--------------------------------|----|

## CAPITULO 7

|  |    |
|--|----|
| 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 92 |
|--|----|

## APENDICES

## BIBLIOGRAFÍA



## DEDICATORIA



A DIOS JEHOVÁ

A MIS PADRES

A MI HERMANO

A MIS AMIGOS

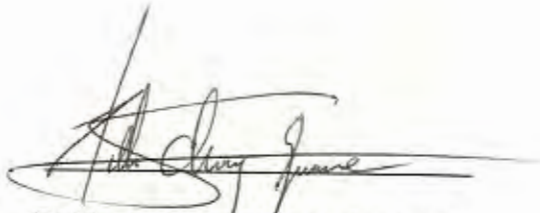
## AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios, A mis Padres. A mis amigos y compañeros del CIBE. A la Msc. Maria Isabel Jiménez, María Jama, Rufino Meza, Enrique Marquez. A Helga Rodríguez von Platen, PhD Directora del CIBE, mi Directora de Tesis. A la Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, al PMBA-PL-480. Al Proyecto VLIR C3 – ESPOL (CIBE). A la Fundación CENAIM – ESPOL. A Sam Stern PhD, Director del CENAIM, al Ing. Yordan Vivanco y al Ing. Andrés Pedrazzoli.

## DECLARACIÓN EXPRESA

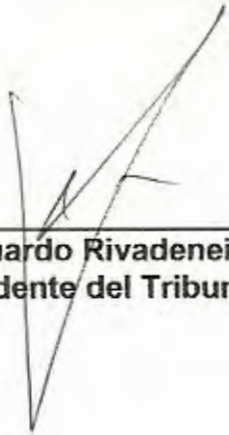
"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)



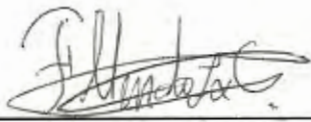
Pablo Antonio Chong Aguirre

## TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



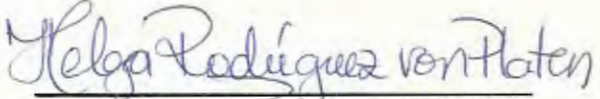
---

Ing. Eduardo Rivadeneira P.  
Presidente del Tribunal



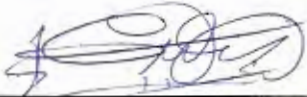
---

Ing. Felipe Mendoza G.  
Miembro del Tribunal



---

Dra. Helga Rodríguez von Platen  
Directora de Tesis



---

Ing. Alberto Ortega U.  
Miembro del Tribunal





## RESUMEN



Es de interés mundial encontrar formas eficaces para el control de la Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* una de las más devastadoras enfermedades que ataca al genero *Musa spp.* El presente estudio esta enfocado en el análisis genético de diferentes poblaciones del hongo extraídas de plantaciones Orgánicas y de plantaciones Convencionales. Estos análisis contribuyen a dar claves sobre la variabilidad genética de las poblaciones, su estructura y forma de dispersión y sobre cómo una posible presión de selección podría cambiar la frecuencia de algunos alelos.

En el presente análisis, se encontró que había una pequeña cantidad de alelos por loci en un promedio de 3.6 alelos. El alelo más común del loci Mf061 tuvo una frecuencia de 0.95. *Fis* o grado de inbreeding fue 0.86 mostrando un alto valor de inbreeding, sugiriendo un efecto fundador en estas poblaciones. La diferenciación entre las poblaciones de las plantaciones Orgánicas vs. plantaciones Convencionales ( $F_{st} = 0.1439$ ), demostró muy baja diferenciación. Esto apoya la teoría de flujo genético a larga distancia en patógenos como *M. fijiensis*. Los altos valores indirectos de flujo genético  $Nm = 1.5$  confirman este hecho. Las poblaciones Orgánicas fueron más

cercanas a la población Salvaje. Poblaciones obtenidas de plantaciones convencionales fueron más distantes y fueron agrupadas en diferente cluster que las poblaciones orgánicas. Los resultados combinados sugieren que existe un enorme flujo genético entre poblaciones. El perfil genético de las poblaciones de haciendas Orgánicas son más similares a las poblaciones Salvajes. La frecuencia alelica y la frecuencia genética fueron similares en estos dos grupos. Las poblaciones de plantaciones convencionales fueron algo diferentes.

Basado en los resultados de otros autores, que han demostrado que la recombinación sexual en *Mycosphaerella spp* tiene una inmensa influencia en la distribución de alelos mutantes de resistencia, en especial, en la resistencia a estrobilurinas; es posible que algunos alelos bajo presión el tiempo suficiente puedan mutar y ser transferidos a las poblaciones salvajes. La implicación de este hecho significa que un alelo resistente puede incrementar sus frecuencias en las poblaciones reemplazando el silvestre no mutado. Este hecho tendrá un gran impacto en toda plantación bananera que adquiera con el tiempo los alelos de resistencia. Con todo, el panorama de las plantaciones Orgánicas es posiblemente el más concordante con la diversidad de las poblaciones en la naturaleza, contrario con la pérdida de diversidad que encontramos en las plantaciones Convencionales con alta



presión de selección. Sugerimos llevar a cabo análisis futuros con un gran número de poblaciones y extender el rango geográfico.

La implicación para los productores bananeros es la de proveer una herramienta de monitoreo de las poblaciones de *M. fijiensis* para la detección de alelos resistentes en sus poblaciones. Estos resultados incluso tienen implicaciones para los procesos de cuarentena para monitorear alelos de resistencia.

Palabras clave: Diversidad genética, flujo de genes, *Mycosphaerella fijiensis*.





## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Pág. |
|---|------|
| FIGURA 5.1. ZONAS GEOGRÁFICAS EN LA PROVINCIA DEL GUAYAS - ECUADOR DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS</i> ..... | 52   |
| FIGURA. 6.2. DENDROGRAMA BASADO EN NEI'S (1972).....  | 84   |
| FIGURA. 6.3. DENDROGRAMA BASADO EN NEI'S (1978).....  | 85   |





## ÍNDICE DE TABLAS

|   | Pág. |
|---|------|
| TABLA 1. DATOS CLIMÁTICOS DE TAURA (FAOCLIM 1994).....                                    | 50   |
| TABLA 2. PCR MIX.....   | 61   |
| TABLA 3. SECUENCIA DE LOS PRIMERS UTILIZADOS EN<br>LA REACCIÓN DE PCR.....                | 62   |
| TABLA 4. DIFERENCIAS EN NÚMERO DE LOS ALELOS DE<br>LOS MICROSATÉLITES.....                | 64   |
| TABLA 5. FRECUENCIA ALÉLICA POR POBLACIÓN.....  | 65   |
| TABLA 6. FRECUENCIA ALÉLICA DE TODOS LOS LOCI.....  | 67   |
| TABLA 7. SUMARIO DE F-STATISTICS Y GENE FLOW<br>(FLUJO GENÉTICO) PARA TODOS LOS LOCI..... | 70   |
| TABLA 8. SUMARIO DE ESTADÍSTICAS DE HETEROCIGOSIS<br>PARA TODOS LOS LOCI.....             | 72   |
| TABLA 9. EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.....  | 73   |



## ABREVIATURAS

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>ATP</b>               | Adenosina Trifosfato                                |
| <b>CIAA</b>              | Cloroformo Isoamil alcohol                          |
| <b>CTAB</b>              | Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide                 |
| <b><i>Fis</i></b>        | Índice de Inbreeding                                |
| <b><i>Fst</i></b>        | Índice de diferenciación genética entre poblaciones |
| <b>ha.</b>               | Hectárea  |
| <b>He</b>                | Heterocigosis esperada                              |
| <b>Het</b>               | Heterocigosis                                       |
| <b>Hom</b>               | Homocigosis   |
| <b>Ho</b>                | Heterocigosis observada                             |
| <b>LRR</b>               | Repeticiones ricas en Leucina                       |
| <b>NaOAC</b>             | Acetato de Sodio                                    |
| <b>NH<sub>4</sub>OAC</b> | Acetato de Amonio                                   |
| <b><i>Nm</i></b>         | Flujo de genes                                      |
| <b>PCIAA</b>             | Fenol (Phenol) Cloroformo Isoamil alcohol           |
| <b>pb</b>                | Pares de Bases                                      |
| <b>Proteína R</b>        | Proteína de resistencia                             |
| <b>PDA</b>               | Papa Dextrosa Agar                                  |
| <b>Qo</b>                | Quinona exterior                                    |
| <b>SAR</b>               | Resistencia sistémica adquirida                     |
| <b>TBE</b>               | Tris Borato EDTA                                    |
| <b>TE</b>                | Tris EDTA   |
| <b>TEH</b>               | Tris EDTA Hipersalino                               |



## INTRODUCCIÓN



La Sigatoka negra es una de las enfermedades de mayor impacto económico para la producción de *Musa spp.* a escala mundial y en especial para el Ecuador como el mayor exportador de banano (1), siendo la causante de pérdidas de hasta el 30% en la producción en ausencia de fungicidas (2). En el año 2001 se exportó banano por un monto de 827 millones de dólares equivalente al 18% del valor de las exportaciones totales de Ecuador. Las principales zonas de producción de banano en Ecuador son: El Oro y Los Ríos con el 31%, y el Guayas con el 30%, y en menor proporción Cañar, Esmeraldas y Cotopaxi. Alrededor del 0.6% del total de la superficie del Ecuador (147,282 ha) están bajo cultivo de banano. En Ecuador, la mayoría de las áreas de producción no pertenece a las compañías multinacionales con extensas zonas de cultivo, sino a los pequeños y medianos hacendados (3).

El costo total en fungicidas para el control de la Sigatoka negra se acerca a los USD 1000/ha, en las grandes plantaciones. Para los pequeños productores, el costo es mayor porque la aplicación aérea no es posible (4). Consecuentemente, los controles químicos son caros y además peligrosos para el ambiente (5).



Los sistemas de control químico utilizados por los bananeros, no solo han producido impactos sociales y ambientales negativos, sino que están alterando las poblaciones del patógeno y su relación con el hospedero, transformando las poblaciones del hongo en patógenos cada vez más resistentes a los químicos. Por ejemplo, se tiene datos de que *M. fijiensis* se ha vuelto resistente a las estrobirulinas en Costa Rica en los últimos 5 años (6).

Siendo el control de la Sigatoka negra uno de los grandes problemas del País, los trabajos de investigación están dirigidos a buscar nuevas estrategias para de control. Los diseños de control más prometedores están en el desarrollo de variedades resistentes, que sirvan como zonas tampón entre las áreas con diferente grado de infección (7). Sin embargo, ha sido difícil encontrar variedades resistentes y de interés comercial. Por otro lado, se realizan trabajos para encontrar productos orgánicos que puedan controlar la enfermedad o al menos reducir su impacto en el campo (8).

El CIBE se encuentra trabajando en esta segunda estrategia y el presente trabajo es una contribución al entendimiento de la distribución de la variabilidad genética y de la estructura de las poblaciones de *M. fijiensis* para



establecer planes de manejo y de reducción de ciclos de aplicación de pesticidas. En un trabajo realizado por el CIBE se encontró que las poblaciones del hongo extraídas tanto de la finca orgánica como convencional infectaban con la misma agresividad plantas *in vitro* de Williams inoculadas artificialmente (8).

En Ecuador falta información sobre las mayores fuentes de inóculo a nivel geográfico, y sobre los factores que influyen la recombinación genética de las poblaciones y el alcance de la influencia de una población en particular a nivel geográfico sobre la estructura genética de las demás poblaciones del hongo.

Por este motivo, el presente estudio intenta conocer las relaciones entre las diferentes poblaciones del patógeno, y cómo éstas son afectadas directa o indirectamente por las estrategias de control químico. En el futuro necesitaremos vigilar cómo las estrategias de control biológico, pueden o no influenciar la diversidad y estructura de estas poblaciones. Por ello, es necesario lograr un estimado de la variabilidad y diferenciación genética de las poblaciones del patógeno en el presente momento y tener una herramienta de medición rutinaria que nos permita monitorear cualquier cambio en las poblaciones del hongo.



# CAPÍTULO 1

## 1. MECANISMOS DE SELECCIÓN NATURAL

Cuando miembros de una misma especie se distribuyen a lo largo de un amplio rango geográfico como lo es *M. fijiensis* que se distribuye continentalmente, las condiciones ambientales que enfrentaran las diferentes poblaciones serán distintas y así también las adaptaciones que deban sufrir para sobrevivir bajo condiciones específicas y ser exitosos. Tras un largo período de tiempo, sus características se habrán desarrollado en diferentes rumbos al punto de no poder volver a ser cruzados entre sí, punto en el cual las poblaciones que divergen pueden considerarse especies separadas. Esta es la razón por la cual, poblaciones aisladas de una especie empiezan a diferenciarse. Esta es una de las razones principales del análisis de genética de poblaciones para monitorear los posibles cambios a nivel de frecuencias alélicas y genotípicas en las poblaciones.



## **1.1. La dinámica genética de las poblaciones en evolución.**

### **1.1.1. Ecología de las poblaciones**

Una población puede identificarse como el conjunto de individuos que puede intercambiar material genético a través del proceso reproductivo y generar descendencia fértil. (9). Los procesos de distribución de las poblaciones se debe en muchos casos al tamaño de la población, es decir al número de individuos efectivos que alcanzan su madurez y que son capaces de reproducirse. Algunos procesos de emigración están relacionados en el caso de los patógenos, a la distribución propia del hospedero o a procesos abióticos que pueden contribuir a su distribución en diferentes áreas (10). La selección (cualquier presión que produzca un cambio hereditario sistemático en una población) actúa como un sistema de retroalimentación, que es transmitida al banco de genes, el cual responde con cambios en contenido y expresión (11).

Los cambios en una población son el resultado acumulativo de la adaptación de sus individuos. Los individuos mejor adaptados tienen más progenie que los menos adaptados, como resultado, los menos adaptados disminuyen en número en la población y así también

disminuyen algunos de los alelos que puedan ser comunes en estas poblaciones (12).

La variación genética es el sustrato de la selección natural y proviene de la recombinación de genes en la reproducción sexual, la inmigración y la mutación. Sin embargo, la recombinación sexual por si misma no produce variación a menos que los alelos sean segregados en diferentes loci. De manera similar la inmigración no produce variación si la población entera es homocigota para un mismo alelo, de manera que la fuente última de variación son las mutaciones (12).

### **1.1.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg**

En 1908 Hardy en Gran Bretaña y Weinberg en Alemania demostraron que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúen ni la selección ni ningún otro factor y no se produzca mutación alguna.

La demostración de este equilibrio implica que las frecuencias génicas (la frecuencia de cada gen o alelo) permanecen constantes de



generación en generación, siempre que la población cumpla las siguientes condiciones ideales: 1. Lo suficientemente grande como para que todos los cambios produzcan una distribución normal. Tampoco debe existir inmigración ni emigración. 2. Los organismos componentes de esa población han de ser diploides y de reproducción al azar (panmixia). 3. En esta población no hay mutaciones, ni selección natural, de modo que los individuos tienen las mismas probabilidades de reproducirse, independientemente de sus genotipos.

El apareamiento aleatorio es un supuesto razonable, pero en la realidad, éste no existe en la mayoría de los casos, ya que siempre hay algún tipo de selección en la pareja. La ley de Hardy-Weinberg sostiene que las proporciones genotípicas permanecerán iguales en generaciones sucesivas de una reproducción sexual de una población. La ley Hardy-Weinberg predice que la frecuencia de los alelos no cambiará. La ecuación que expresa la frecuencia genotípica de la siguiente generación es:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

En poblaciones naturales los criterios de la ley Hardy-Weinberg nunca se encuentran por completo. Ocurren mutaciones, los individuos se

mueven entre poblaciones, la selección natural se lleva a cabo, los apareamientos no se dan al azar. Todas estas circunstancias cambian los genotipos de una generación a otra y actúan como una fuerza evolutiva dentro de una población. Por esta razón se debe considerar a la ley Hardy-Weinberg como modelo teórico, es decir, una distribución contra la cual podemos comparar nuestras observaciones (13). Consecuentemente, las diferentes presiones de selección sobre los principales patógenos que atacan los cultivos es uno de los factores más importantes en los posibles cambios a escala genética y poblacional.

### 1.1.3. Procesos de Mutación.



En el caso de las especies de *Mycosphaerella* se ha demostrado, que las mutaciones pueden distribuirse de forma rápida y por ello se tiene altos niveles de flujo genético.

Trabajos en *Mycosphaerella graminicola* mostraron que el patógeno ha desarrollado desde el año 2003 una rápida resistencia a fungicidas del tipo de las estrobilurinas (14). La resistencia en este caso se debe a una mutación puntual en el gene del citocromo b en el genoma



mitocondrial. Los trabajos sobre la resistencia en *M. graminicola* de Ware demostraron que la recombinación entre cepas resistentes y susceptibles a estrobilurinas fue exitosa en un 100%, sin importar la concentración del fungicida sobre semillas de trigo (14).

#### 1.1.3.1. Orígenes de la resistencia.

Existe evidencia circunstancial de que los genes mutantes que intervienen en un mecanismo de resistencia particular pre-existen dentro de la población (15). Esta hipótesis considera que antes de que el fungicida haya sido alguna vez usado en el campo, una mutación de resistencia a este ya existe en ciertos individuos de la población, esta mutación pueda que no confiera ninguna ventaja de crecimiento o supervivencia en los organismos de la población, incluso cause una posible desventaja. Debido a estas características estos genes se mantienen en la población a frecuencias muy bajas, desapareciendo y reapareciendo espontáneamente muchas veces en el tiempo (15).

Una vez que los efectos del fungicida comienzan a actuar sobre la población, entre los supervivientes del tratamiento la relación de los



individuos con mutaciones de resistencia en la población aumenta de 1 en 100 a 1 en 10, en este momento se presentan las dificultades de manejo y la resistencia es detectable. Si el tratamiento con fungicidas es efectivo, dejando pocos supervivientes, la selección se acelerara rápidamente. Esta teoría es llamada gen mayor de resistencia (major gen resistance) y es el patrón que caracteriza la resistencia a muchos de los mayores grupos de fungicidas utilizados, incluyendo a los benzimidazoles, fenilamidas y dicarboximidas (15).

Un ejemplo de resistencia a fungicidas lo podemos observar en el caso de las estrobirulinas, una de las moléculas antifúngicas utilizadas en la actualidad. El modo de acción de las estrobirulinas esta basado en bloquear o enlazarse al sitio de enlace exterior quinona (Qo) localizado en el complejo proteico mitocondrial citocromo bc1 (complejo III) para evitar la respiración mitocondrial (16). La resistencia a las estrobirulinas se da por la sustitución de un nucleótido que previene el enlace en el sitio Qo (6, 17). En la mayoría de los casos, la guanina es remplazada por la citosina para convertir el aminoácido glicina en alanina en la posición 143 (G143A) de la proteína citocromo b. Esta pequeña mutación restaura la respiración mitocondrial evitando el acceso de las estrobirulinas al

Qo, y aumentando la resistencia 100 veces más que el de las cepas susceptibles (14).

Debido a que el DNA mitocondrial es de exclusiva herencia materna es lógico concluir que la resistencia a estrobilurinas proviene de esta fuente. En el estudio de *M. graminicola* la mayoría de la fertilización provenía de ascogonia de cepas resistentes y la espermatia de las cepas susceptibles, con el resultado de una progenie que contiene exclusivamente genomas mitocondriales resistentes. Al parecer en este caso, la presión del fungicida actúa de manera negativa en la producción de ascogonia en las cepas susceptibles y estimula la producción de espermatia en estas (14). Es muy posible que estas mismas fuerzas estén implicadas en el desarrollo de la resistencia a estrobilurinas por parte de *Mycosphaerella fijiensis*.

#### **1.1.4. Flujo genético.**

El flujo génico es un proceso mediante el cual determinados alelos son intercambiados entre poblaciones separadas geográficamente. Según este planteamiento, el flujo génico puede incrementar sustancialmente el tamaño de una población mediante el incremento de tamaño del "vecindario genético" a través del cual se intercambian alelos y



genotipos y facilitar el movimiento de alelos entre poblaciones individuales del patógeno. Por tanto, patógenos que presenten un alto grado de flujo génico presentarán una diversidad genética mayor porque presentan un tamaño de población efectivo mayor. Los patógenos con mayor riesgo serán aquellos que producen propágulos con capacidad de dispersión a larga distancia, que con frecuencia presentan vecindarios genéticos que comprenden continentes enteros (18).

Se ha comprobado que la dispersión a larga distancia de las esporas de hongos por medio del viento, puede distribuir enfermedades a nivel continental, este fenómeno puede incluso restablecer enfermedades, incluso, cuando los hospederos son cultivos de estación (18).

La naturaleza de la dispersión estocástica de la dispersión aérea a larga distancia causa efectos fundadores en las poblaciones de los patógenos. La dispersión a larga distancia es una estrategia de supervivencia importante para muchos organismos, ayudando a la colonización de nuevas áreas, o en las migraciones entre estaciones, como por ejemplo en habitats durante el verano, o en invierno (19). Este hecho es relevante en las enfermedades de cultivos, debido a



que la dispersión de sus esporas por medio del viento puede darse entre cientos o miles de kilómetros, causando la dispersión a escala continental o global. Esta migración regula el reestablecimiento de la enfermedad en regiones donde existen estaciones con climas desfavorables para el crecimiento (18).

Para los hongos biotróficos obligados, la producción de una enorme cantidad de esporas, esparcidas por viento de un hospedero susceptible a otro son esenciales para su reproducción y supervivencia, ya que dependen de su hospedero para sobrevivir (18).

El riesgo de dispersión global se incrementa por la limitada diversidad genética de muchos de los cultivos modernos, comparados con la diversidad que se observa en las variedades Silvestres. Ejemplos extremos se tienen en el café (20) y banano (21), que por lo general son un solo tipo de clon, propagado en los trópicos, susceptibles a sus respectivos patógenos (18).

Una sola mutación puede conferir al patógeno la virulencia necesaria, para la interacción positiva de gen a gen. Los rangos de dispersión



en el caso de hongos patógenos de cultivos son de 500Km o más, y puede deberse a un único paso a las nuevas áreas de colonización de continente a continente, o colonizaciones graduales a través del continente (18).

#### 1.1.5. La deriva genética.

Las frecuencias génicas pueden cambiar por razones puramente aleatorias, a lo que se llama deriva genética, debido a que cualquier población consta de un **número finito de individuos**. La frecuencia de una gen puede por ello cambiar de una generación a otra gracias a lo que se llaman errores de muestreo, ya que de todos los genes de la población son sólo una pequeña fracción muestreada que pasará a la siguiente generación (12).

Si en una población de 1.000 individuos, la frecuencia de  $a$  es 0,5 en una generación, en la siguiente generación puede ser, por azar, de 0,505 ó de 0,493, a causa de la producción fortuita de unos pocos más o unos pocos menos descendientes de cada genotipo. En la segunda generación habrá otro error de muestreo, que ahora trabaja sobre la





nueva frecuencia génica, así que la frecuencia de **a** puede llegar de 0,505 hasta 0,511 ó bajar a 0,498.

Este proceso de fluctuación aleatoria continúa de generación en generación, sin que ninguna fuerza empuje a la frecuencia a retornar a su valor original. De este modo, el resultado final es que **la deriva provoca que las frecuencias génicas sean  $p=1$  ó  $q=1$  ( $q=0$  ó  $p=1$ , respectivamente)**. Tras este final, ya no es posible ningún cambio: **la población se ha hecho homocigóta** (12).

Una población aislada a partir de la primera también sufre esta deriva genética aleatoria, pero en lugar de hacerse homocigótica para el gen **A**, puede hacerse para el gen **a**. A medida que el tiempo transcurre, las poblaciones aisladas divergen entre ellas, perdiéndose heterocigosidad: la variación que aparecía **en** las poblaciones aparece ahora **entre** poblaciones (12).

Cuanto mayor sea el número de individuos de la población, menor será la diferencia entre las frecuencias de una generación y otra, aunque lo que cuenta no es el número real de individuos. Si no hubiera otros procesos de cambio evolutivo, tales como la mutación y



la selección natural, **las poblaciones llegarían al final a tener un solo alelo de cada gen**, aunque se tardase muchas generaciones en llegar a ello. La razón es que, tarde o temprano, uno u otro alelo sería eliminado por la deriva genética sin posibilidad de que reapareciera por mutación o migración (12).

#### **1.1.5.1. Efecto Fundador**

Una situación extrema de la deriva genética se da cuando se establece una nueva población a partir de pocos individuos. Es lo que Ernst Mayr ha llamado efecto fundador. El ejemplo típico es lo que ocurre en islas oceánicas, con poblaciones numerosísimas establecidas por muy pocos individuos. Las frecuencias de muchos genes pueden ser diferentes en los pocos colonizadores y en la población de la que proceden, y ello puede tener efectos duraderos en la evolución de tales poblaciones aisladas. Sería un caso de "deriva aguda", el resultado de una única generación de muestreo, seguida de varias generaciones durante las cuales la población sigue siendo pequeña (12).

En el caso de los hongos patógenos de los cultivos modernos, la invasión a nuevos territorios se da principalmente por la dispersión a larga distancia de muy pocas esporas por medio del viento o del material contaminado a cientos de kilómetros hacia cultivos con una muy baja diversidad genética. La naturaleza estocástica de esta dispersión a larga distancia es causante del efecto fundador, donde la colonización se da por pocos individuos viables, que serán la base genética de las futuras poblaciones (18).

El efecto fundador ha sido uno de los principales factores evolutivos en el caso de las estructuras de las poblaciones de *M. fijiensis* (22). El efecto fundador explica, en primer lugar la pérdida de la diversidad genética en las poblaciones de África, América Latina y el Caribe. Segundos efectos fundadores recientes o la recolonización crea excesos en la diversidad genética en un loci neutral selectivo en comparación con la diversidad genética esperada de la observación de alelos bajo una deriva de mutación equilibrada, hecho demostrado en el estudio de estas mismas poblaciones. Por ultimo el efecto fundador explica la diferenciación genética encontrada entre las poblaciones de África, Latinoamérica y el Caribe respectivamente (22).





## 1.2. Selección Sexual

Podemos ver cómo los numerosos errores congénitos del metabolismo se dan porque un alelo recesivo interfiere una ruta metabólica y causa la letalidad de los homocigotos. Son casos que sirven para ilustrar las diferencias en eficacias biológicas provocadas por la sustitución de un gen. En muchos organismos eucarióticos como los hongos microscópicos el intercambio del material genético vía reproducción sexual, se da por la existencia de mecanismos de identificación celular que estimulan el cruzamiento, donde los individuos tienen o son células con identidades diferentes consideradas parejas de cruce (23). La reproducción sexual al azar de *M fijiensis* a causado un alto nivel de diversidad genética de las poblaciones a escala global (24).

En el caso de ascomicetos como *Mycosphaerella fijiensis*, de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de algunos hongos filamentosos, receptores celulares de feromonas son esenciales para el reconocimiento de las células que son "parejas de cruce", o de sus núcleos antes de la meiosis (23).





Estudios realizados en *M. graminicola* han demostrado que el sexo tiene gran importancia en cuanto a la rápida distribución y evolución de la resistencia a fungicidas. De hecho parece ser que la presión causada por los fungicidas en este caso las estrobilurinas estimula preferencias maternas en la recombinación de las cepas resistentes a estrobilurinas, de manera que esta misma presión estimula a que las cepas susceptibles se comporten como donadores paternos (14). Las preferencias maternas aceleran la distribución de la resistencia después del evento inicial de la mutación en un solo nucleótido, que probablemente ocurre en una alta frecuencia.

En la recombinación entre aislados de hongos hermafroditas con sistemas heterotálicos bipolares, la reproducción sexual exitosa depende de la compatibilidad de idiomorfos de acople (*mat1-1* y *mat1-2*), los cuales son independientes de las diferencias morfológicas masculino o femenino de los gametangios que pueden ser producidos por aislados con ambos ideomorfos (14). En el orden de las *Dothidiales*, y en el género *Mycosphaerella* (25), el gametangio masculino son las espermagonias y el gametangio femenino las ascogonias. En las especies heterotálicas cada aislado tiene un idiomorfo de acople pero produce gametangios tanto femeninos como masculinos y es autoesteril (14).

En el caso de la resistencia a estrobirulinas la progenie resultante de los cruces fue casi completamente resistente. Esto podría deberse a la siguiente hipótesis, de que ambas gametangios femeninos y masculinos son producidos por cepas tanto resistentes como susceptibles. Cuando la ascogonia femenina es producida por los parentales resistentes, la ascogonia fertilizada contiene exclusivamente genomas mitocondriales resistentes. En ese caso, la fertilización exitosa depende de que la espermatia se origine de las cepas susceptibles. Caso contrario si la ascogonia proviene de cepas susceptibles las ascogonias fertilizadas tendrán exclusivamente genomas mitocondriales susceptibles, las hifas, la formación de las células madre del asca y las ascosporas, serán totalmente inhibidas (14).

Las pruebas de estrobilurinas-sensitivos PCRs sobre la progenie demostraron que casi toda la siguiente generación fue resistente a este fungicida. Esto quiere decir que las cepas susceptibles participaron en la reproducción sexual aun bajo una alta presión del fungicida. Aparentemente la presión del fungicida no solo, no pudo detener la recombinación, sino que también indujo a la preferencia en cuanto al tipo de célula de apareamiento (femenino en el caso de las cepas resistentes) (14).





### 1.2.1. Heterocigosidad

Los individuos diploides son tanto homocigotos como heterocigotos en un locus dado. Los individuos heterocigotos tienen la ventaja sobre los individuos homocigotos en el hecho de que los alelos recesivos deletéreos han sido suprimidos en la condición homocigota (26). Los organismos heterocigotos, por la producción de una mezcla de diferentes enzimas o proteínas, son capaces de funcionar en muchas diferentes maneras y sobre un amplio rango de condiciones ambientales. La superior fuerza o robustez de los individuos heterocigotos se debe a su versatilidad bioquímica comparada con los correspondientes individuos homocigotos (27). Las diferencias alélicas en varios loci son visualizadas por medio de electroforesis. El número de alelos y la diversidad genética (heterocigosidad) son los medios más usados para estimar la variación genética (28).

El número de alelos es la medida más directa de diversidad y se refiere al número de estados variantes de un locus (Ej. Formas alternativas de una proteína, sitios dentro del genoma que pueden ser cortados con enzimas de restricción, variación en el número de secuencias repetitivas en el ADN, etc.). La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) se refiere a la proporción de individuos que son heterocigotos, es



decir copias distintas en el mismo locus (este parámetro se encuentra muy relacionada con la naturaleza reproductiva de la especie estudiada). La heterocigosidad esperada o diversidad genética ( $H_e$ ) es un concepto introducido por Nei (28) para referirse a la probabilidad de que dos alelos seleccionados aleatoriamente en un genotipo dado sean diferentes.



## CAPÍTULO 2

### 2. DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL

Diversidad y diferenciación genética son conceptos ampliamente aplicados en genética de poblaciones. Ambos conciernen con la medida de variación, sin embargo ellos difieren en que la diversidad aplica a la variación dentro de una única población y diferenciación aplica a variación entre un número arbitrario de poblaciones (29). Fundamentalmente la estructura genética se refiere a la distribución no aleatoria de los genes en el espacio y en el tiempo.

#### 2.1. Estructura de las poblaciones

El concepto de diferenciación esta orientado en la medición de la cantidad de diferencias alelicas o genotípicas entre las

subpoblaciones y esta basado en las frecuencias alelicas que difieren entre subpoblaciones.





## CAPÍTULO 3

### 3. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

#### 3.1. Origen y Distribución de la Sigatoka negra.

La Sigatoka negra tuvo su centro de origen localizado en el Sudeste de Asia, fue reportada por primera vez en febrero de 1963, en la isla Viti Levu en Fiji, desde donde se diseminó al resto del mundo. Esta enfermedad desplazó a la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*) en los lugares donde se estableció y desarrolló (30).

Según Johnston (31) y Graham (32) la Sigatoka Negra estaba presente en los Estados Federados de Micronesia, Nueva Caledonia, Papua Nueva Guinea, Filipinas, Samoa, las islas Salomón, Tahití, Taiwán, Tonga, Vanuatu y el oeste de Malasia,

desde que fuera reportada inicialmente. En la misma fecha Meredith y Lawrence (33) identificaron la enfermedad en las islas de Hawai, y Stover (34) reportó su presencia en las islas de Cook y Niue.

La distribución de la enfermedad en América Latina y el Caribe esta bien documentada. Esta apareció por primera vez en Honduras en 1972, siendo encontrada junto con la Sigatoka Amarilla en la colección de germoplasma de la United Fruit Company en la FHIA en La Lima Honduras. Esta colección era utilizada para el estudio de la Sigatoka Amarilla por lo que siempre permaneció sin controles químicos. Pero analizando transparencias de color tomadas a la colección se pudo identificar la presencia de la enfermedad en 1969, por lo que se puede deducir que fue introducida y permaneció oculta (30).

Después de la detección de la Sigatoka Negra, poco a poco se pudo ver como ésta se incrementaba en plantaciones comerciales, finalmente se evidenciaron ataques severos; para diciembre de 1973 a febrero de 1974, ya se contaba con un área de 12.000 hectáreas afectadas. Stover y Dickson (34) y Buddenhagen (35) postularon que cuando la Sigatoka Negra se estableció por primera vez en el valle



de Ulúa, el patógeno no contaba con el suficiente nivel de virulencia para remplazar a la Sigatoka Amarilla, y solo después de alcanzar este nivel de virulencia pudo hacerse dominante y distribuirse rápidamente. Mientras que el subgrupo Cavendish y los plátanos eran atacados por Sigatoka Negra en las zonas bajas de Honduras se podía observar como la Sigatoka Amarilla seguía presente en plantaciones a altitudes mayores (30).

Entre los años 1973 y 1980, serios casos de ataques de Sigatoka Negra fueron reportados en Belice, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica; para 1981 la Sigatoka negra ya se encontraba en todos los Países entre México y Panamá pudiendo ser observado en algunas Zonas de Colombia. En 1987, la enfermedad fue detectada en el norte de Ecuador y en menos de cuatro años ya se encontraba en las zonas de producción bananera Sur de este país. Al Oeste de Venezuela y Bolivia, fue reportada en 1991, siendo Brasil, el último país sudamericano que reportó su presencia en 1998 (36). La forma de dispersión de *M. fijiensis*, ha afectado directamente el comportamiento genético de sus poblaciones. Sea que la dispersión a larga distancia haya sido causado por la influencia del viento o por el material contaminado, la cantidad de esporas viables colonizadoras fueron un porcentaje muy



reducido de la población en su punto de origen, como es común en este tipo de dispersión estocástica. Podemos decir de esta manera que la cantidad de alelos diferentes presentes en las poblaciones que colonizaron por primera vez cada continente es muy baja y es de esperarse que la diversidad genética de la mayoría de las poblaciones se incremente en las zonas geográficas más cercanas al punto de origen y se reduzca en las que se encuentra más alejadas o que sean menos influenciadas por el viento o el material contaminado (Apéndice A).

### **3.2. Biología de *Mycosphaerella fijiensis***

La Sigatoka negra es causada por el ascomiceto, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo: *Paracercospora fijiensis* Morelet). 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. Pero, puede también referirse a una especie en la cual los sexos se presentan en

talos separados, de modo que para efectuar la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes.

El nombre de *M. fijiensis* var. *difformis* se le asignó al hongo que causa la "Sigatoka Negra" por Stover en 1976 (34), siendo validado por Mulder y Stover en 1976 (37), sobre la base del examen de muestras de *Musa* sp. colectadas en La Lima, Honduras. Para separar a *M. fijiensis* var. *Fijiensis* y *M. fijiensis* var. *difformis* se usó como criterio el estado anamorfo, debido a que no existen diferencias morfológicas en el estado teleomorfo. La var. *difformis* se caracteriza por la presencia de un estroma que da origen a pocos o densos fascículos de conidióforos, en contraste con la ausencia de estroma para el estado anamorfo de la var. *Fijiensis*. El anamorfo de *M. fijiensis* var. *fijiensis* y *M. fijiensis* var. *difformis* previamente referido al género *Cercospora* Fres (Morelet) Mulder & Stover, fue transferido a un nuevo género, *Paracercospora*, por Deighton bajo la combinación de *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton y *P. fijiensis* var. *difformis* (Mulder & Stover) Deighton. La diagnosis de estos hongos se basa en observaciones microscópicas debido a la semejanza que existe en los síntomas que producen en los tejidos afectados; igual ocurre con sus diferencias morfológicas que son



confusas, siendo difícil su diferenciación, por lo que Pons (38) sinonimia a estos dos hongos conservando el nombre de *M. fijiensis*.

### 3.2.1. Taxonomía y Morfología.

*Mycosphaerella fijiensis* fue descrita en primera instancia por Leach en 1964 (39). Esta especie de ascomiceto, heterotálico fue identificado por Stover en 1963 (40) como el causante de la Sigatoka Negra.

**DIVISIÓN** *Eumycota*

**SUBDIVISIÓN** *Ascomycotina*

**CLASE** *Loculoascomycetes*.

**ORDEN** *Dothideales*

**GENERO** *Mycosphaerella*.



Los conidióforos se desarrollan en pizcas marrón o rayas tempranas en el envés de la hoja y continúan siendo producidos hasta el estadio de mancha reportado por Meredith y Lawrence en 1969 (33). Estos emergen solos o en pequeños grupos desde la cavidad estomática dentro del



borde de la lesión, la mayoría son producidos en el envés de la hoja aunque también existe producción en el haz. (41).

Los conidióforos son de color pálido a café oliváceo, siendo más pálidos en la punta. Usualmente son más angostos en la punta que en la base. Las conidias se forman independientemente en el ápice del conidióforo, lateralizándose a medida que el conidióforo se desarrolla. Hasta cuatro conidias maduras pueden estar unidas a un solo conidióforo las conidias no son incoloras pueden ser desde verde pálido hasta oliva, su forma es ovalada a cilindro-ovalada con uno a 10 septos. (41). El espermogonio se desarrolla cuando las rayas se convierten en manchas y son más abundantes en el envés de la hoja, consistentemente asociada con los conidióforos. El espermogonio tiene forma oval casi globosa, midiendo entre 55-88  $\mu\text{m}$  por 35-50  $\mu\text{m}$ , el ostiolo es ligeramente prominente y ubicado hacia el poro estomático, la espermatia madura es hialina y mide entre 2,5-5  $\mu\text{m}$  por 1,0-2,5  $\mu\text{m}$  La peritecia puede variar en sus características pero generalmente es globosa con un diámetro de 25-45  $\mu\text{m}$ , la pared de los peritecios es café oscuro con tres o más capas de células poligonales. Las ascosporas son

de color hialino de 12,5-16,5  $\mu\text{m}$  por 2,5-2,8  $\mu\text{m}$  compuestas de dos celdas ligeramente más estrechas en el septo (41).

### **3.2.2. Mecanismos de dispersión de *Mycosphaerella fijiensis*.**

Existen dos posibles formas de dispersión del patógeno propuestas por Jones y Alcom (1982), quienes propusieron que los vientos pueden llevar las esporas del hongo entre continentes. Estas observaciones están de acuerdo con las investigaciones directas de dispersión que muestran la importancia del viento en la propagación de las ascosporas de los hongos patógenos entre plantas y entre plantaciones a nivel local y global (18). La otra explicación es la introducción de material infectado por medio del hombre.

Como sugieren algunos autores en los países subdesarrollados se utilizaron las hojas del genero *Musa* como material de empaque, siendo el material infectado el responsable de infecciones a larga distancia, y por supuesto es el caso del brote reportado de Sigatoka Negra en Florida:

De allí la importancia cuarentenaria de la importación de germoplasma infectado por parte de los granjeros locales.

### **3.2.3. Ciclo de Vida.**

Los ciclos sexuales y asexuales del hongo ocurren simultáneamente como en la mayoría de las *Mycosphaerellas*, para el caso específico de *M. fijiensis* los ciclos sexuales son más abundantes.

#### **3.2.3.1. Reproducción de *Mycosphaerella fijiensis***

El patógeno produce conidios (reproducción asexual) y ascosporas (reproducción sexual), ambas tienen la capacidad de infectar. Son formadas bajo condiciones de alta humedad, siendo dispersadas por la lluvia, el agua de riego y el viento. Debido a su abundancia y pequeño tamaño, las ascosporas son más importantes que los conidios al dispersar la enfermedad entre plantas y dentro de las plantaciones (Apéndice B) (41). La reproducción sexual se da por compatibilidad o tipo de "sexo" mating (acoplamiento). Solo líneas de "mating" opuestos, son capaces de cruzarse y



producir ascosporas. El tipo de "mating" depende de los genes que se encuentran en el locus *MAT*. Los productos de los genes en el locus *MAT* son feromonas o factores que controlan la producción de feromonas, el reconocimiento de dichas feromonas se da por los receptores en la membrana (23). La recombinación heterotálica, crea un alto potencial para que ocurran cambios genéticos dentro de las poblaciones de *M. fijiensis*, lo que puede conducir a una rápida adaptación a las condiciones ambientales cambiantes. Ambas fases sexuales anamorfa y teleomorfa pueden estar presentes en las hojas infectadas, es así como posiblemente se dispersaron de un continente al otro, por el movimiento de las hojas infectadas utilizadas para diferentes propósitos. La alta tasa de variación genética esta dada por la reproducción sexual en el hongo (42) siendo esta la forma dominante de la reproducción de *M. fijiensis*.

El ciclo sexual comienza con la producción de un espermogonio en las lesiones foliares necróticas. El rol preciso de esta estructura, no ha sido del todo establecido, pero se cree que su principal función radica en acercar a las hifas receptoras para la fusión nuclear y la iniciación de un

peritecio. Los peritecios se desarrollan en las manchas maduras y coalescentes con su centro deprimido, con cada peritecio las ascas madura gradualmente, uno a la vez, incluso en épocas de sequía (43). Bajo condiciones favorables las ascas pueden ser producidas dentro de 2 semanas de haber aparecido los estadios primarios de infección. Con pocos minutos de humedad en la lámina foliar después de una lluvia, las ascosporas se descargan del asca madura y se diseminan por la corriente de aire. Estas pueden liberarse hasta por dos horas después que la lámina foliar se humecta. (40).

En lesiones foliares sometidas a fluctuaciones normales de humedad y sequía las ascosporas se pueden mantener viables en los peritecios por alrededor de 8 semanas. El ciclo asexual de *M. fijiensis* se basa en la producción de conidiosporas. Las conidias se forman diariamente durante periodos de alta humedad y épocas secas. En *M. fijiensis* las conidias están formadas en grupos conocidos como esporodoquias en la cavidad estomática de la parte inferior de las hojas. Estas conidias pueden dispersarse con la ayuda del agua y del viento. Una vez en dispersión estas conidias solo



pueden sobrevivir hasta su germinación por pocas horas (44, 45, 46, 47).

### 3.2.3.2. Epidemiología de la enfermedad.



Las esporas usualmente germinan dos o tres horas después de su descarga en la superficie húmeda de una hoja. La temperatura mínima y máxima para el crecimiento del tubo germinativo se encuentra entre 12-36°C con una temperatura óptima de 27°C (45) aún así la velocidad con la que crece el tubo germinativo varía considerablemente con la temperatura.

El tubo germinativo penetra en el estoma a las 48-72 horas sobre los 20°C. (48, 49). Se requiere una lámina de agua en la superficie para proveer la humedad relativa necesaria para que crezca el tubo germinativo. La mayoría de las infecciones ocurren en las hojas más jóvenes (las tres primeras) y en la hoja cigarro (Apéndice C) (41).

Una vez que la infección se establece una o más hifas vegetativas emergen del estoma en el envés, desarrollándose



en conidióforos o creciendo sobre la superficie de la hoja paralela a las venas, e infectan alrededor de 3 mm en radio al estoma invadido (41). La invasión de un estoma a otro finalmente resulta en el desarrollo de las rayas necróticas características de la enfermedad (Apéndice D).

El periodo de incubación, es decir el tiempo entre la infección y el primer síntoma en la hoja, es alrededor de 10 a 14 días bajo un sistema de desarrollo ideal. El periodo de incubación puede variar en diferentes cultivares de *Musa*, esta diferencia en tiempo parece no estar relacionada directamente con la resistencia de los cultivares (41).

Tanto Sigatoka amarilla causada por *M. musicola* como Sigatoka negra causada por *M. fijiensis* son enfermedades específicas de las hojas del banano y plátano (genero *Musa*). Ambos patógenos son indiferenciables sobre la base de la morfología de sus estados sexuales o teleomorfo pero fácilmente diferenciadas por la morfología de sus estados asexuales o anamorfos (41).



Si comparamos la diferencia en agresividad de *M. fijiensis* con *M. musicola* puede deberse posiblemente a las características de su epidemiología ya que a diferencia de *M. musicola*, en los síntomas de afectación de *M. fijiensis* no se observa siempre una secuencia cronológica desde las hojas mas jóvenes a las mas viejas, apareciendo en hojas mas viejas junto a los síntomas avanzados, también rayas provenientes de infecciones mas nuevas posiblemente provenientes del crecimiento epifilico de hifas que salen de las lesiones establecidas y de infecciones secundarias por ascósporas y conidios.

A diferencia de *M. musicola*, *M. fijiensis* puede también afectar las hojas lanceoladas de los hijos espada ("sword suckers") (41). Las temperaturas máximas de desarrollo de ambos organismos también son diferentes siendo de 22 a 24°C en el caso de *M. musicola* y de 26 a 28°C en el caso de *M. fijiensis* (41), de modo que el crecimiento de *M. fijiensis* esta mejor adaptado para los climas calidos, donde se desarrolla mejor su hospedero *Musa sp.*

### 3.2.3.3. Control de la Enfermedad

#### 3.2.3.3.1. Control Químico



Entre los principales controles utilizados se encuentran los de las moléculas químicas con propiedades antifúngicas. Las aplicaciones en las plantaciones comerciales se realizan por avioneta, y en las haciendas pequeñas atomizados con mochilas motorizadas o en tractores.

Los fungicidas, pueden dividirse en 3 grupos principales que son: protectantes, de acción local y sistémica. Las sustancias con propiedades sistémicas como por ejemplo los Benzimidazoles actúan sobre las células del hongo (husos acromáticos, tubulinas, etc.), Las Morfolinas, Triazoles que actúan sobre la biosíntesis de ergosterol, y por ultimo las Estrobilurinas que actúan sobre procesos energéticos en la mitocondria de las células del patógeno (50). Dado a que todo hongo requiere respiración mitocondrial para la mayoría de la



producción de ATP, las estrobilurinas son por obvias razones efectivas a una amplia variedad de hongos patógenos, incluyendo a ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos y oomicetos (14). Debido a la especificidad de sus modos de acción, la probabilidad de resistencia es muy alta.

#### **3.2.3.3.2. Prácticas y Control Orgánico**

Las labores culturales en el cultivo, pueden reducir las condiciones favorables de crecimiento y propagación de los patógenos (presión del inoculo). Para poder reducir el exceso de humedad relativa de la plantación y el movimiento ascendentes de aire que transportan las esporas se puede trabajar sobre por ejemplo: la densidad de siembra, el deshoje oportuno y un monitoreo periódico de la salud de la población de plantas de banano (50).

Es conocido que la poda sanitaria, efectuada de forma racional, es una herramienta efectiva para reducir la

fuente de inóculo del patógeno en el campo. Una desventaja de este método es la supervisión que se necesita para asegurar que las instrucciones se cumplan adecuadamente, y el trabajo de eliminación de las hojas infectadas. Se suele hacer el "despunte" cuando el daño a las hojas es puntual y localizado, y el deslamine cuando la afectación excede el 60% del área foliar. Las hojas cortadas se suelen agrupar y colocar boca abajo para reducir el área expuesta de la fuente de inóculo (50).

El control orgánico es un conjunto de acciones dirigido a reducir la enfermedad sobre la plantación, con sustancias naturales biodegradables reduciendo las condiciones ambientales favorables para el patógeno, y dando las mejores condiciones de desarrollo para el cultivo. Entre los cambios metabólicos que se presentan en la resistencia localizada están: el refuerzo de la pared celular por el depósito de polisacáridos, proteínas, glicoproteínas y compuestos fenólicos insolubles; así mismo se estimula a que por medio de un metabolismo secundario se produzcan pequeñas cantidades de

sustancia con propiedades antibióticas como por ejemplo fitoalexinas o también síntesis de reguladores de defensa como Acido salicílico, etileno y metabolitos derivados de lípidos acumulando proteínas relacionadas a la defensa y péptidos (51, 52).



#### 3.2.4. Variabilidad patogénica.

Los estudios de variabilidad genética mediante el polimorfismo de los fragmentos de ADN geonómico (RFLP) de *M. fijiensis*, evidencian una gran variabilidad entre las poblaciones de diferentes partes del mundo (53). Los diferentes aislamientos de *M. fijiensis* provenientes de Papua Nueva Guinea, mostraron una mayor variación en la patogenicidad que aislamientos de otros lugares (47). Esta variabilidad fue detectada en plántulas de un grupo estándar de genotipos de *Musa*, propagados por cultivo de tejido e inoculados con la suspensión conidial obtenida de los aislamientos estudiados. La reacción de los genotipos enfrentados a *M. fijiensis* fue diferencial, sugiriendo interacciones específicas (47).

Algunos genotipos considerados resistentes o hipersensibles como *M. acuminata* sp. *Vurmannicoides*, accesión Calcutta 4 y Yangambi Km 5



fueron atacados por diferentes aislamientos. Fullerton y Olson en 1995 describieron lesiones necróticas con peritecios en hojas de Yangambi Km.5; este cultivar está reportado como altamente resistente por lo que se deduce que algunas razas de *M. fijiensis* pueden infectar a este cultivar. En otros experimentos utilizando plántulas de banano se encontraron diferencias significativas en la patogenicidad en *M. fijiensis*. Jácome y Schuh en 1992, reportan que cinco aislamientos de *M. fijiensis* de Honduras inducían diferentes niveles de severidad definido como el porcentaje de área foliar necrosada por Sigatoka, en Gran Enano. Romero en 1997, trabajó con aislamientos de diferentes zonas geográficas y demostró las diferencia en la severidad de la enfermedad midiendo el tiempo después de la inoculación hasta la aparición de las primeras diez rayas, sus resultados indicaron la variación de la agresividad. Varios han sido los estudios bajo inoculaciones naturales en lo que se ha visto diferencias en la agresividad del patógeno (2, 43, 46, 47, 51).

Estudios realizados con aislamientos procedentes del centro de origen, y otras partes del mundo demostraron la amplia diferencia y espectro de acción de los aislamientos frente a los genotipos de *Musa* spp. En este caso se encontraron aislamientos capaces de atacar a Calcuta 4 pero no a T8, mientras que aislamientos de la misma zona

eran capaces de atacar a T8 y no a Calcuta 4 (46). La evolución de la patogenicidad se hace evidente cuando se logra vencer la resistencia de un genotipo, como en el caso de la variedad Paka reportado como resistente (52), se vio afectada por *M. fijiensis* en 1989. Otros estudios de las variaciones multigénicas en la patogenicidad de Sigatoka negra, otro caso similar fue el genotipo Pisang Mas, que es resistente en África y Papua Nueva Guinea, pero susceptible en Honduras.

### **3.2.5. Diversidad genética de *M fijiensis*.**

La estructura genética de *M. fijiensis* ha sido estudiada en los últimos años, y estos trabajos han dado información en relación a la filogenia de la especie. Müller et al. usaron marcadores para examinar 25 aislados de *M. fijiensis*, escogidas en micro y macro escalas geográficas de Nigeria, encontrando una gran diversidad genética.

El trabajo de Rivas (22) encontró diversidad genética entre aislados de diferentes lesiones en una planta e incluso de la misma lesión en los diferentes lugares estudiados (poblaciones de África, Latinoamérica y el Caribe). Un alto nivel de diversidad genética y la presencia de poblaciones mating al azar fue sugerida en el estudio global de Carlier et al. (24). El trabajo de Rivas et al. (22) fue a una escala menor de



incluso una sola plantación. Sin embargo, este trabajo, mostró el mismo alto nivel de diversidad genética, incluso a escala de una sola planta. Carlier et al. examinaron la estructura genética global de las poblaciones de *M. fijiensis*, detectando un alto nivel de diferenciación de las poblaciones. La diversidad genética que encontró fue mayor en Papua Nueva Guinea y en las Filipinas. Carlier et al propusieron que esa población fue parte del centro de origen de *M. fijiensis*. Las poblaciones de Sur América, África y Las Islas del Pacífico, tenían alelos en común con los de Papua y Filipinas pero su diversidad genética era mucho menor.

Estos grupos son genéticamente homogéneos y específicos para cada una de estas regiones. Esto sugiere que la introducción de *M. fijiensis* a partir del sudeste asiático fueron limitadas e independientes unas de otras. Las poblaciones de América Latina muestran una mayor similitud con las de las islas del pacífico que con otras poblaciones (41). Estos trabajos muestran que el conocimiento de la estructura genética de *M. fijiensis*, y la ocurrencia del flujo de genes, tiene una relevancia directa con los procedimientos de cuarentena y control (7).



# CAPÍTULO 4

## 4. MICROSATÉLITES

Los marcadores microsatélites (54) son repeticiones una a continuación de la otra de solo unos pocos pares de bases (1 – 6 pb) que se repiten  $n$  veces y se encuentran dispersos en el genoma; son desarrollados a partir de librerías geonómicas de las cuales se generan las regiones flanqueantes este proceso es llamado diseño de primer o cebadores, que se utilizan para obtener la amplificación de las regiones productos de interés por medio de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) (54).

Estas regiones individualmente amplificadas mostrarán polimorfismo, si es que existe algún cambio en la secuencia del fragmento de ADN. Esto se observará por las diferencias en la longitud de los fragmentos amplificados existentes en el genoma de los individuos distintos.

Este método detecta el polimorfismo codominante de una Secuencia Simple Repetida o microsatélite (SSR). Los loci de los microsatélite ofrecen reproducibilidad y generan un gran número de alelos detectables. Las repeticiones SSR son arreglos de mono-, di-, tri-, tetra- o penta- nucleótidos extensamente dispersos a través del genoma. Estas secuencias muestran altos niveles de variación genética basada en diferencias en las unidades repetidas en tanda de un locus. Los oligonucleótidos componen las secuencias cortas repetidas en tandem por ejemplo (GATA)<sub>4</sub> (55).

Alternativamente, los SSR polimórficos de loci individuales han sido detectados por medio de PCR usando primers de regiones flanqueantes de locus específicos. Estos ensayos tienen una alta cantidad de información y son de extrema utilidad para mapeos genéticos. Se han hecho muchos estudios basados en estos marcadores para la investigación de la estructura genética de las poblaciones, muchos de estos trabajos dirigidos a la investigación de la biología evolutiva.

El grado de estimación de los microsatélites es comparable al de otros marcadores como los RFLPs (56). Es de tener en cuenta al estudiar una población, que los microsatélites tienen una alta tasa de mutación, dato que

se deberá tomar en cuenta a la hora del análisis de los datos. Estos ensayos tienen una alta cantidad de información y son de extrema utilidad para mapeos genéticos. Sin embargo estos marcadores necesitan información precisa de las secuencias de cada locus de ADN.





# CAPÍTULO 5



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Situación Geográfica y climática de la zona

La recolección de las muestras para este proyecto se dieron de la siguiente manera: Las muestras Silvestres fueron obtenidas de la zona de Mariscal sucre provincia del Guayas. Dos de las haciendas de estudio fueron localizadas en la zona de Balao, una de ellas con control Orgánico (S 2°50'16.90", W 79°45'03.80") y la otra con control Convencional de la enfermedad (S 2°53'50", W 79°42'21"). No fue posible obtener los datos concernientes a los sistemas de cultivo de estas haciendas.

Dos de las haciendas del estudio están localizadas cerca del cantón Taura ( $2^{\circ}18'35.76''S$ ,  $79^{\circ}44'53.48''W$ ) en la provincia del Guayas al sur de la costa del Ecuador. Existe una separación física de 7Km. entre ambas haciendas. La proximidad fue un factor importante para la comparación de los datos de estas dos haciendas, debido a su similitud en variables como: temperatura, precipitación, foto periodo y el viento, factores clave en el desarrollo del hongo (57).

El promedio de temperatura diario es de  $18.8^{\circ}C$  a  $32^{\circ}C$ , siendo él mas alto en diciembre y mayo (Tabla. 1). La estación lluviosa va de enero hasta mayo, los otros meses conforman la estación seca.

**TABLA 1.**  
**DATOS CLIMÁTICOS DE TAURA (58)**

| Climatic factor (unif)                      | # Years observ. | Jan   | Feb   | Mar   | Apr   | May  | Jun  | Jul  | Aug  | Sep  | Oct  | Nov  | Dec  |
|---|-----------------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Mean Daily Max. Temperature ( $^{\circ}C$ ) | 10              | 31.3  | 31.1  | 31.8  | 32.0  | 31.1 | 29.7 | 28.8 | 29.5 | 30.4 | 30.2 | 30.3 | 31.8 |
| Mean Daily Min. Temperature ( $^{\circ}C$ ) | 10              | 21.4  | 21.6  | 21.8  | 21.9  | 21.0 | 19.7 | 19.1 | 18.8 | 19.3 | 19.7 | 19.8 | 20.7 |
| Mean Temperature ( $^{\circ}C$ )            | 21              | 26.0  | 26.1  | 26.6  | 26.8  | 26.0 | 24.8 | 23.9 | 24.0 | 24.5 | 24.6 | 25.0 | 26.0 |
| Mean Monthly Rainfall (mm)                  | 21              | 178.0 | 183.0 | 215.0 | 152.0 | 55.0 | 8.0  | 1.0  | 0.0  | 2.0  | 3.0  | 13.0 | 32.0 |
| # Days With Rain                            | 20              | 14    | 14    | 15    | 9     | 5    | 2    | 1    | 0    | 0    | 1    | 1    | 3    |
| Mean Dew Point Temperature ( $^{\circ}C$ )  | 10              | 22.8  | 23.3  | 23.7  | 23.3  | 22.9 | 21.9 | 20.9 | 20.7 | 20.9 | 20.7 | 20.7 | 21.4 |
| Mean Relative Humidity (%)                  | 20              | 80.0  | 83.0  | 83.0  | 83.0  | 82.0 | 83.0 | 82.0 | 81.0 | 79.0 | 78.0 | 77.0 | 76.0 |
| Mean Nightly Temperature ( $^{\circ}C$ )    | 10              | 24.5  | 24.8  | 24.9  | 25.1  | 24.2 | 22.9 | 22.2 | 22.2 | 22.8 | 23.0 | 23.1 | 24.2 |
| Mean Daily Temperature ( $^{\circ}C$ )      | 10              | 26.1  | 26.1  | 26.6  | 26.8  | 27.9 | 26.5 | 25.7 | 26.1 | 26.8 | 26.8 | 26.9 | 28.2 |
| Mean Daily Sunshine Fraction (h/N)          | 7               | 0.2   | 0.2   | 0.3   | 0.3   | 0.3  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  | 0.2  |
| Mean Daily Wind Speed (m/day)               | 13              | 0.8   | 0.7   | 0.8   | 0.9   | 0.7  | 0.9  | 1.1  | 1.2  | 1.3  | 1.2  | 1.2  | 1.0  |
| Mean Daily Vapour Pressure (mbar)           | 21              | 26.8  | 26.1  | 26.8  | 29.2  | 27.5 | 26.0 | 24.3 | 24.1 | 24.2 | 24.2 | 24.4 | 25.5 |



La Hacienda Orgánica, Km. 24 Vía Duran-Tambo (S 2°15'35.37" W 79°42'34.58") cubre un área de 223 ha de las cuales 196 ha están bajo cultivo. Esta plantación ha estado bajo cultivo durante 11 años. En 1997 comenzó la transición al cultivo orgánico reduciendo la utilización de pesticidas en un 50%. La Sigatoka negra se controla con procedimientos agroclturales cortando semanalmente las hojas infectadas con Sigatoka negra. La certificación de producción Orgánica fue hecha por ECOCERT.

La hacienda Convencional, km 27 Vía el Triunfo tiene 87.5 ha bajo cultivo. La hacienda pertenece al grupo DOLE. Esto significa que la fruta producida es comercializada y exportada por DOLE. Esta plantación lleva bajo producción 16 años. Para el control de Sigatoka negra, se utilizan tanto protectantes como fungicidas sistémicos. En los últimos 3 años se han aplicado fumigaciones de 7 ciclos por año, es decir 5 aplicaciones de fungicidas sistémicos y 2 diferentes protectantes. Herbicidas (glifosato) son aplicados dos veces cada 6 - 8 semanas en la época lluviosa y dos veces cada 10 semanas en la época seca.

La distancia física entre las haciendas de la zona de Balao es de 8,24Km aproximadamente. La distancia entre esta zona y las muestras Silvestres es de 90km. La distancia entre las fincas situadas en la zona de Taura es de



7Km. y la distancia de la zona de Taura con las Silvestres es de 32,87Km (Fig. 5.1).

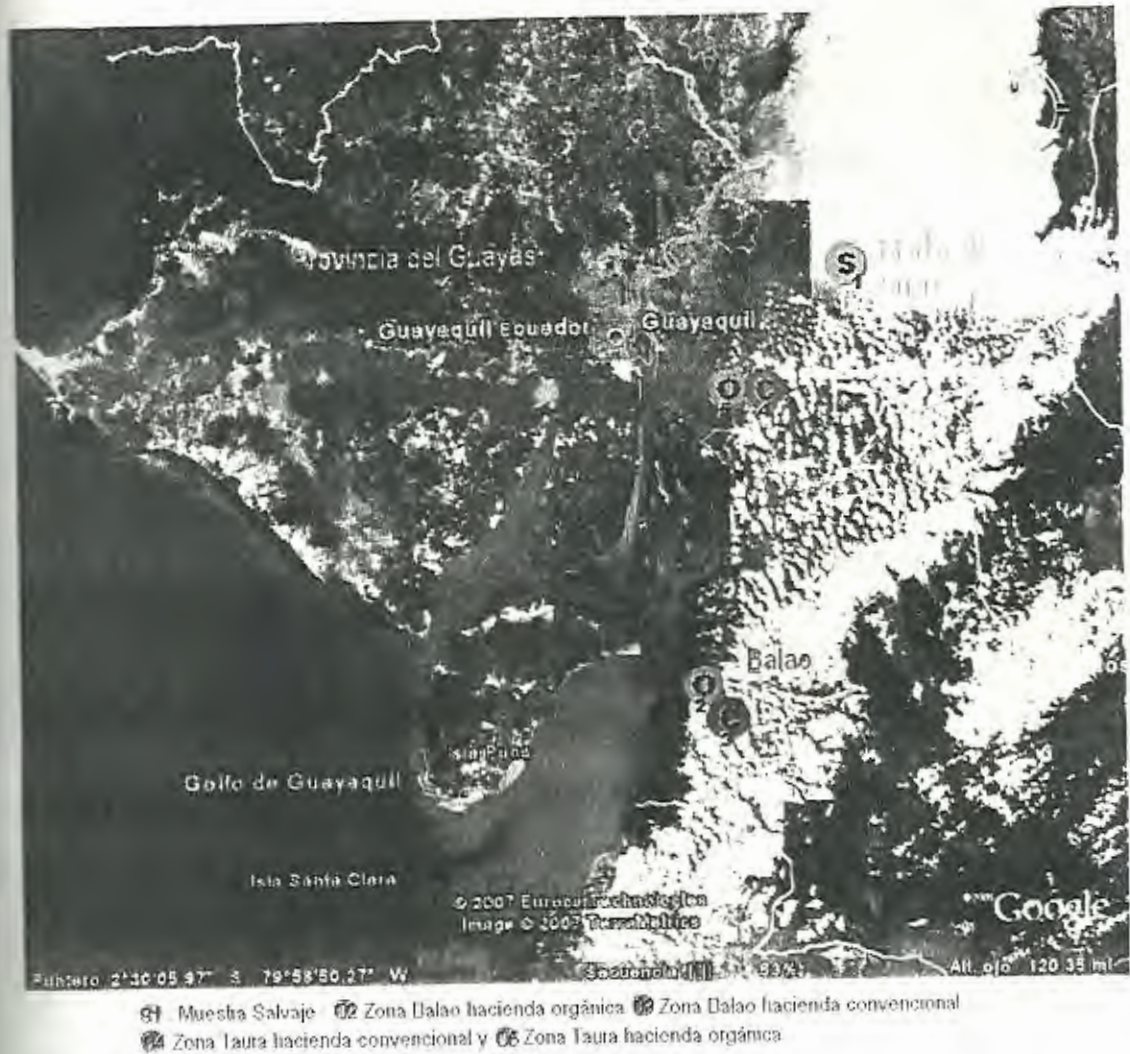


FIG. 5.1. ZONAS GEOGRÁFICAS EN LA PROVINCIA DEL GUAYAS - ECUADOR DE LAS POBLACIONES ESTUDIADAS DE *Mycosphaerella fijiensis*.



## 5.2. Muestreo

El muestreo se realizo, recolectando de los focos de infección en las zonas seleccionadas. Se tomaron las muestras con una distribución de 5 plantas por Ha, recolectando la hoja 7 u 8, que presentan la infección en su etapa de reproducción, cuando las plantas de banano se encuentran cerca de la cosecha.

Las muestras son mezcladas aleatoriamente y se procesan 25 discos de descarga. Luego de la descarga, se procede a seleccionar 5 cajas para recolección de las esporas. Se utilizaron 30 colonias monoascosporicas de *M. fijiensis*.





### 5.3. Protocolo de Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis*

1. Recolección de muestra infectada en campo (hojas de banano con manchas características de la enfermedad en estadio 6 de desarrollo).
2. Los pedazos de hoja son recortados aproximadamente de 2 cm<sup>2</sup> de área previa identificación de los pseudotesios conteniendo las ascosporas.
3. Los pedazos de hoja serán grapados con la cara inferior (envés) hacia afuera en papel filtro previamente recortado con un diámetro ligeramente superior a la tapa de una caja petri.
4. Se construye una cámara húmeda utilizando un envase hermético que contendrá en su interior algodón humedecido con agua destilada y las hojas grapadas en el papel filtro.
5. Se incuba la muestra durante 48 horas, luego se procede a la descarga.
6. Se colocan los papeles filtro con los pedazos de hoja en una placa o caja petri, frente a un medio conteniendo agar agua únicamente.
7. Las hojas descargarán por el lapso de 2 horas las ascosporas sobre el medio, luego del cual se desechan los papeles con las hojas de banano.
8. En un ambiente estéril se lleva la placa al microscopio estero y se recolectan las ascosporas con una aguja, colocándolas en una placa con medio PDA.



9. 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).
10. Se colocan los medios inoculados en una zaranda a 120 RPM durante 15 o 30 Días.
11. El Micelio del Hongo es filtrado en papel filtro estéril, se lava con agua destilada tibia 30 - 40°C y es secado a 50°C durante 48 horas.



**5.4. Medios de cultivo**

**Medio Agar agua.**

Agregar 4 gr. de agar en un litro de agua de - ionizada

**Medio PDA**

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

**Medio líquido V8**

Agregar 300 mL de jugo V8 + 3 gr. de  $CaCO_3$  + 500 mL de agua de - ionizada en un vaso de precipitación con capacidad para un litro, hervir por 30 minutos y centrifugar a 2000 G durante 10 minutos. Recoja el sobrenadante y lleve el medio a un Litro.



### 5.5. Protocolo de extracción de DNA (59).

1. Pesar de 300 a 500 mg. de muestra seca o liofilizada y macerar la muestra en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Colocar el material macerado en un tubo para centrifuga de polipropileno con capacidad para 15 mL.
3. Agregue 7 mL de Tampón de extracción a 65°C e incube por 1h, mezclando constantemente el contenido, luego deje reposar por 5 min.
4. Agregue CIAA 1:1 volumen mezcla y centrifugue a 2000 G por 10 min.
5. Recupere el sobre nadante y agregue 700 µL de CTAB 10%.
6. Precipite el DNA con 1:2 volúmenes de etanol 100%.
7. Centrifugue a 2000 G 5 min.
8. Resuspenda el pelet en 3 mL TEHS incube a 65°C por 10 min y deje reposar a temperatura ambiente toda la noche.
9. Precipite el DNA con 1:2 volúmenes de etanol 100%.
10. Resuspenda el pelet en 600 µL de TE y agregue Ribonucleasa A ha una concentración de 100 µg/µL, incubar 30 min.
11. Agregue PCIAA 1:1 volumen mezcla y centrifugue a 2000 G por 20 min.
12. Recupere el sobre nadante y agregue 30 µl 5M de NaCl.
13. Precipite el DNA con 1:1,2 volúmenes de etanol 100%.
14. Recoja el DNA con un asa de vidrio o con el tip de una pipeta automática.





15. Lave el DNA en una solución Etanol 76% y Acetato de Sodio 0,2 M por 20 minutos.
16. Lave el DNA en una solución Etanol 76% y Acetato de Amonio 10 mM durante 2 minutos.
17. Seque el DNA 20 min o más a temperatura ambiente.
18. Resuspenda en 100  $\mu$ L de agua pura.

### 5.6. Soluciones

#### TBE 5X\*

|                  |  |          |
|------------------|--|----------|
| Tris Base        |  | 4.00 g   |
| Acido Bórico     |  | 27.50 g  |
| EDTA 0.5M (pH 8) |  | 20.00 mL |



#### Tampón de extracción de DNA\*

|                         |      |          |
|-------------------------|------|----------|
| CTAB                    | 1%   | 10.00 g  |
| NaCl                    | 0.7M | 40.90 g  |
| Tris - HCl              | 50mM | 7.85 g   |
| EDTA                    | 10mM | 3.72 g   |
| $\beta$ -Mercaptoetanol | 1%   | 10.00 mL |

---

\* Para un Litro de Solución

**Solución CTAB 10%**

|      |       |
|------|-------|
| CTAB | 10%   |
| NaCL | 0.7 M |

**Solución TE\***

|             |          |
|-------------|----------|
| Tris (pH 8) | 10.00 mM |
| EDTA (pH 8) | 1.00 mM  |

**Solución TEHS\***

|             |          |
|-------------|----------|
| NaCL        | 1.00 M   |
| Tris (pH 8) | 10.00 mM |
| EDTA (pH 8) | 1.00 mM  |

**Solución de Acetato de Amonio**

|                     |          |
|---------------------|----------|
| NH <sub>4</sub> OAC | 10.00 mM |
| Etanol              | 76 %     |

**Solución de Acetato de Sodio**

|        |        |
|--------|--------|
| NaOAC  | 0.20 M |
| Etanol | 76 %   |



**Soluciones de Tinción de Plata****Solución de fijación**

Acido Acético 10%

Etanol 20%

**Solución de Impregnación**

Nitrato de Plata 2.00 g/L

**Solución de Rebelado**

Hidróxido de Sodio 30.00 g/L

Formaldehído 7.00 mL/L

**Solución stock**

Carbonato de Sodio 7.25 g/L



## 5.7. Protocolo de PCR

Tabla 2

## PCR MIX

| Solución stock              | Concentración      | Volumen       |
|-----------------------------|--------------------|---------------|
| Tampón Taq. 10X             | 1X                 | 1.50 $\mu$ L  |
| MgCL <sub>2</sub> 50 mM     | 2.00 mM            | 0.60 $\mu$ L  |
| dNTps 5 mM                  | 0.20 mM            | 0.60 $\mu$ L  |
| Primers F 10 $\mu$ M        | 0.24 $\mu$ M       | 0.36 $\mu$ L  |
| Primers R 10 $\mu$ M        | 0.24 $\mu$ M       | 0.36 $\mu$ L  |
| Taq DNA polimerasa          | 1 U                | 0.20 $\mu$ L  |
| <i>M. fijiensis</i> DNA     | 5 – 10 ng/ $\mu$ L | 1.20 $\mu$ L  |
| H <sub>2</sub> O deionizada | -                  | 10.37 $\mu$ L |
| TOTAL                       | -                  | 15.00 $\mu$ L |

## Programa de PCR:

1. 94°C por 4 min.
2. 30 ciclos de:
  - a. 94°C por 30 seg.
  - b. 55°C por 45 seg.
  - c. 72°C por 45 seg.
3. 72°C por 7 min.
4. 4°C indefinido (fin de la reacción)



**TABLA 3**  
**SECUENCIA DE LOS PRIMERS UTILIZADOS EN LA REACCIÓN DE PCR**  
**(60).**

| LOCUS    | REPETICIÓN   | SECUENCIA (5' - 3') F Y R                       | TAMAÑO<br>ESPERADO<br>(PB) |
|----------|--------------|---|----------------------------|
| MfSSR005 | (CAACACA)4   | TCCAAATTCCATCGTTGTCA<br>CGATGATTTGGGTGGTCAAGCTA | 158                        |
| MfSSR018 | (GAA)9       | TAGTGCGAGTAGCGAGGCAG<br>GACCTAAAGGCAATAGGGCTT   | 104                        |
| MfSSR025 | (CA)18       | CATGACTGACGTCCTCTTCTCA<br>ATATGGGAAGGGGAAAGGTG  | 176                        |
| MfSSR058 | (TG)7G3(TG)9 | TTCGCAAAAAGTCCTTCAGC<br>GATGGAGGCACGAAAAGGTA    | 166                        |
| MfSSR061 | (CAA)8       | TGCAAACCTCTGATGCTGGAC<br>TTCAGAGGCTCGTCTTTGGT   | 124                        |
| MfSSR137 | (GT)19       | GGCTCGAAGTGGACTAGCAC<br>CTGGTCGAGGGTCGGG        | 243                        |
| MfSSR145 | (GT)19       | GATGAGAAGGATCTCGTCGG<br>GGCTCGAAGTGGACTAGCAC    | 181                        |
| MfSSR194 | (GTT)10      | CATCTTTGAGGAGGCAAAGC<br>AGATTCCTTAGGCGGCATTT    | 294                        |
| MfSSR203 | (GTT)7       | CTCTGTGGCGTAAGTGGGTG<br>TGATTGCACAGCAGGAAGAG    | 227                        |
| MfSSR244 | (TG)29       | GGCCATTTCAATTTGCAAGAC<br>ATGCCACAAAATCTCCATCC   | 215                        |
| MF137*   |              | GGCGCCCCCGGAGGCCGTCTA                           |                            |
| MM137**  |              | GCGGCCCGCGGAGGTCTCCTT                           |                            |
| R835     |              | GGTCCGTGTTTCAAGACGG.                            |                            |

\* PRIMER ESPECIFICO PARA *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*  
 \*\* PRIMER ESPECIFICO PARA *MYCOSPHAERELLA MUSICOLA*





## CAPÍTULO 6

### 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las poblaciones estudiadas demostraron un alto nivel de homogeneidad, que se debe al alto porcentaje de alelos homocigotos en y entre las poblaciones (Apéndice E y F). De los 10 loci estudiados, el locus Mf194 presentó la mayor cantidad de alelos 7 en total.

Los locus que presentaron la menor cantidad de alelos fue el Mf203 con 2 alelos, y el promedio general de alelos fue de 3.6. Ninguno de los individuos tuvo el rango completo de todos los alelos encontrados.

Los loci utilizados para este estudio fueron originalmente aislados y desarrollados a partir de muestras de África y Norte América (Nigeria y



México respectivamente, (60), por ello posible las diferencias observadas en el número de alelos por locus (Tabla. 4).

**TABLA 4**  
**TABLA COMPARATIVA DEL NUMERO DE ALELOS ENCONTRADOS EN ECUADOR, MÉXICO Y NIGERIA**

| Locus    | Repetición   | Tamaño Esperado (pb) | Numero de alelos |        |         |
|----------|--------------|----------------------|------------------|--------|---------|
|          |              |                      | Nigeria          | México | Ecuador |
| MfSSR005 | (CAACACA)4   | 158                  | 1                | 3      | 4       |
| MfSSR018 | (GAA)9       | 104                  | 1                | 1      | 3       |
| MfSSR025 | (CA)18       | 176                  | 3                | 2      | 5       |
| MfSSR058 | (TG)7G3(TG)9 | 166                  | 1                | 2      | 3       |
| MfSSR061 | (CAA)8       | 124                  | 1                | 3      | 3       |
| MfSSR137 | (GT)19       | 243                  | 3                | 3      | 4       |
| MfSSR145 | (GT)19       | 181                  | 2                | 3      | 3       |
| MfSSR194 | (GTT)10      | 294                  | 3                | 2      | 7       |
| MfSSR203 | (GTT)7       | 227                  | 2                | 3      | 2       |
| MfSSR244 | (TG)29       | 215                  | 3                | 2      | 2       |

El alelo más frecuente en todas las poblaciones fue el alelo de 181pb del locus Mf025, con una frecuencia en las poblaciones de 0.9067 y el menos frecuente fue el alelo de 198pb del locus Mf061 con una frecuencia de 0.0036 en las poblaciones (Tabla. 5 y 6).





TABLA 5

## FRECUENCIA ALÉLICA POR POBLACIÓN

 POLITECNICA DEL LITORAL  
 BIBLIOTECA "GONZALO ZEVALLOS"  
 F. I. M. C. D.

Locus: loc-1(Mf005)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3  | Pop4  | Pop5         | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|-------|-------|--------------|-------|--------|
|   | N | 28    | 29    | 30    | 21    | 23           |       |        |
| p | A | 0.786 | 0.379 | 0.233 | 0.429 | 0.413        | 0.447 | 0.448  |
| p | B | 0.214 | 0.621 | 0.767 | 0.571 | 0.543        | 0.546 | 0.543  |
| p | C | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | <b>0.022</b> | 0.004 | 0.004  |
| p | D | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | <b>0.022</b> | 0.004 | 0.004  |

Locus: loc-2(Mf018)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3  | Pop4         | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|--------|
|   | N | 27    | 30    | 30    | 22           | 23    |       |        |
| p | A | 0.722 | 0.850 | 0.917 | 0.886        | 0.957 | 0.864 | 0.866  |
| p | B | 0.278 | 0.150 | 0.083 | 0.068        | 0.043 | 0.129 | 0.125  |
| p | C | 0.000 | 0.000 | 0.000 | <b>0.045</b> | 0.000 | 0.008 | 0.009  |

Locus: loc-3(Mf025)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3  | Pop4  | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|   | N | 28    | 29    | 30    | 22    | 25    |       |        |
| p | A | 0.000 | 0.172 | 0.000 | 0.091 | 0.080 | 0.067 | 0.069  |
| p | B | 0.000 | 0.000 | 0.017 | 0.023 | 0.000 | 0.007 | 0.008  |
| p | C | 0.982 | 0.828 | 0.917 | 0.886 | 0.920 | 0.907 | 0.907  |
| p | D | 0.018 | 0.000 | 0.067 | 0.000 | 0.000 | 0.019 | 0.017  |

Locus: loc-4(Mf058)

|   |   | Pop1         | Pop2  | Pop3  | Pop4  | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|   | N | 28           | 28    | 25    | 27    | 26    |       |        |
| p | A | 0.357        | 0.107 | 0.240 | 0.185 | 0.654 | 0.306 | 0.309  |
| p | B | 0.607        | 0.893 | 0.760 | 0.815 | 0.346 | 0.687 | 0.684  |
| p | C | <b>0.036</b> | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.007 | 0.007  |
| p | D |              |       |       |       |       |       |        |

Locus: loc-5(Mf061)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3         | Pop4  | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------|
|   | N | 28    | 30    | 30           | 26    | 23    |       |        |
| p | A | 0.964 | 0.933 | 0.967        | 0.692 | 0.957 | 0.905 | 0.903  |
| p | B | 0.036 | 0.067 | 0.017        | 0.308 | 0.043 | 0.091 | 0.094  |
| p | C | 0.000 | 0.000 | <b>0.017</b> | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.003  |

Locus: loc-6(Mf137)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3  | Pop4  | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|   | N | 28    | 30    | 30    | 26    | 24    |       |        |
| p | A | 0.071 | 0.000 | 0.083 | 0.231 | 0.375 | 0.141 | 0.152  |
| p | B | 0.536 | 0.333 | 0.800 | 0.577 | 0.271 | 0.511 | 0.503  |



|   |   |       |              |       |       |       |       |       |
|---|---|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| p | C | 0.000 | <b>0.533</b> | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.116 | 0.107 |
| p | D | 0.393 | 0.133        | 0.117 | 0.192 | 0.354 | 0.232 | 0.238 |

Locus: loc-7(Mf145)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3  | Pop4  | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|   | N | 22    | 28    | 30    | 26    | 24    |       |        |
| p | A | 0.205 | 0.357 | 0.183 | 0.231 | 0.375 | 0.269 | 0.270  |
| p | B | 0.341 | 0.536 | 0.667 | 0.577 | 0.271 | 0.492 | 0.478  |
| p | C | 0.455 | 0.107 | 0.150 | 0.192 | 0.354 | 0.238 | 0.252  |
| p | D |       |       |       |       |       |       |        |

Locus: loc-8(Mf194)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3         | Pop4  | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|--------------|-------|-------|-------|--------|
|   | N | 27    | 30    | 30           | 27    | 24    |       |        |
| p | A | 0.000 | 0.000 | <b>0.400</b> | 0.000 | 0.000 | 0.087 | 0.080  |
| p | B | 0.093 | 0.383 | 0.000        | 0.111 | 0.271 | 0.170 | 0.172  |
| p | C | 0.148 | 0.000 | 0.000        | 0.167 | 0.000 | 0.062 | 0.063  |
| p | D | 0.000 | 0.033 | 0.000        | 0.019 | 0.000 | 0.011 | 0.010  |
| p | E | 0.000 | 0.017 | 0.350        | 0.000 | 0.000 | 0.080 | 0.073  |
| p | F | 0.000 | 0.000 | <b>0.033</b> | 0.000 | 0.000 | 0.007 | 0.007  |
| p | G | 0.759 | 0.567 | 0.217        | 0.704 | 0.729 | 0.583 | 0.595  |

Locus: loc-9(Mf203)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3  | Pop4  | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
|   | N | 25    | 28    | 30    | 22    | 22    |       |        |
| p | A | 1.000 | 0.929 | 0.700 | 0.545 | 0.955 | 0.827 | 0.826  |
| p | B | 0.000 | 0.071 | 0.300 | 0.455 | 0.045 | 0.173 | 0.174  |

Locus: loc-10(Mf244)

|   |   | Pop1  | Pop2  | Pop3  | Pop4         | Pop5  | All_W | All_UW |
|---|---|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|--------|
|   | N | 24    | 29    | 30    | 23           | 20    |       |        |
| p | A | 0.208 | 0.000 | 0.100 | 0.435        | 0.000 | 0.143 | 0.149  |
| p | B | 0.000 | 0.000 | 0.000 | <b>0.043</b> | 0.000 | 0.008 | 0.009  |
| p | C | 0.792 | 1.000 | 0.900 | 0.522        | 1.000 | 0.849 | 0.843  |

Pop1 = Silvestre, Pop2 = Balao Orgánico, Pop 3= Balao Convencional, Pop 4= Taura Convencional, Pop 5= Taura Orgánico Los frecuencias alelicas en negrita y subrayadas son los alelos únicos por población.



**TABLA 6**  
**FRECUENCIA ALÉLICA DE TODOS LOS LOCI**

| All Loc | Mf005  | Mf018  | Mf025  | Mf058  | Mf061  |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A       | 0.4466 | 0.8636 | 0.0672 | 0.3060 | 0.9051 |
| B       | 0.5458 | 0.1288 | 0.0075 | 0.6866 | 0.0912 |
| C       | 0.0038 | 0.0076 | 0.9067 | 0.0075 | 0.0036 |
| D       | 0.0038 |        | 0.0187 |        |        |
| E       |        |        |        |        |        |
| F       |        |        |        |        |        |
| G       |        |        |        |        |        |

| All Loc | Mf137  | Mf145  | Mf194  | Mf203  | Mf244  |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A       | 0.1413 | 0.2692 | 0.0870 | 0.8268 | 0.1429 |
| B       | 0.5109 | 0.4923 | 0.1703 | 0.1732 | 0.0079 |
| C       | 0.1159 | 0.2385 | 0.0616 |        | 0.8492 |
| D       | 0.2319 |        | 0.0109 |        |        |
| E       |        |        | 0.0797 |        |        |
| F       |        |        | 0.0072 |        |        |
| G       |        |        | 0.5833 |        |        |

Siete de los loci mostraron alelos únicos en diferentes poblaciones, algunos de ellos como se muestra en la tabla 5 con frecuencias muy bajas en la población. Así tenemos que para el locus codificado Mf005 la población Orgánica de la hacienda de la zona de Taura presenta 2 alelos únicos 202pb y 265pb (Tabla. 5) con frecuencias en las poblaciones de 0.022, las más bajas en relación con el resto de poblaciones.

Para el locus Mf018 la población de la hacienda con control Convencional de la zona de Taura presenta un único alelo de 120pb (Tabla. 5) con la menor frecuencia en las poblaciones 0.045.

El locus Mf025 presento un alelo de 179pb en frecuencias muy bajas en ambas poblaciones de control Convencional, pero totalmente ausentes en las poblaciones con control Orgánico y en la población de control Silvestre. A su vez un aislado heterocigoto de la población Silvestre presenta un único alelo de 190pb inexistente en las demás poblaciones.

El locus Mf058 presento un alelo único en la población Silvestre, también con la menor frecuencia 0.036. El locus Mf061 presento un único alelo de 198pb (Tabla. 5) en la población de la zona de Balao con control Convencional de la enfermedad con frecuencias de 0.017 la menos frecuente. En el caso del locus Mf137 un alelo con frecuencia 0.533 fue el mas frecuente y único en la población de la zona de Balao con control Orgánico de la enfermedad.

El locus mas polimórfico fue el Mf194 con 7 alelos diferentes, de los cuales dos el de 270pb y 292pb (Tabla. 5) fueron únicos para la población de la zona de Balao con control Convencional de la enfermedad, y se encontraba entre



la frecuencia más alta de 0.400 y una de las frecuencias más bajas de 0.033 para dicha población.

Es interesante el hecho de que este locus posee un alelo de 280pb compartido entre una población de control Orgánica de la zona de Balao y una de control Convencional de la Zona de Taura, con frecuencias bajas de 0.033 y 0.019 respectivamente, único en estas dos poblaciones. Si bien este último alelo está en muy bajas frecuencias muestra la influencia entre poblaciones, indicando posiblemente que la distancia geográfica entre ambas poblaciones no es lo suficientemente grande para evitar la recombinación sexual, o que existe intercambio de material contaminado entre ambas haciendas.

El locus Mf244 también mostró un alelo único de 203pb (Tabla. 5) con una frecuencia baja de 0.043 en la población de control Convencional en la zona de Taura. Tanto el Loci Mf018 como el Mf194 fueron los que mostraron la mayor cantidad de alelos heterocigotos en las poblaciones.

El índice de *Fst* que indica la estructura de las poblaciones fue en promedio 0,1439 cercano a Colombia de 0.145 (61) (Tabla. 7), algo menor que el esperado para las poblaciones de Latinoamérica de 0,30 y de África de 0,19



(22), mostrando la poca variabilidad entre las poblaciones. Los libros de texto consideran generalmente un valor  $F_{st}$  de 0,15 como un valor medio de diferencia y valores mayores a 0,25 valores muy altos de diferenciación genética entre las poblaciones. Sin embargo es necesario conocer experimentalmente las características genéticas de la especie en estudio, para poder establecer una escala de valor precisa para las poblaciones de cada especie.

**TABLA 7**  
**SUMARIO DE F-STATISTICS Y GENE FLOW (FLUJO GENÉTICO) PARA**  
**TODOS LOS LOCI**

| Locus | Sample Size | Fis           | Fst           | Nm*           |
|-------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| Mf005 | 262         | 0.8993        | 0.1318        | 1.6471        |
| Mf018 | 264         | 0.3928        | 0.0593        | 3.9658        |
| Mf025 | 268         | 0.5456        | 0.0431        | <b>5.5548</b> |
| Mf058 | 268         | 0.9606        | 0.1693        | 1.2262        |
| Mf061 | 274         | 0.9131        | 0.1299        | 1.6751        |
| Mf137 | 276         | 0.9356        | 0.1710        | 1.2120        |
| Mf145 | 260         | 0.9478        | 0.0721        | 3.2194        |
| Mf194 | 276         | 0.7210        | 0.1833        | 1.1140        |
| Mf203 | 254         | 1.0000        | 0.2111        | 0.9342        |
| Mf244 | 252         | 1.0000        | 0.2181        | <b>0.8965</b> |
| Mean  | 265         | <b>0.8563</b> | <b>0.1439</b> | <b>1.4870</b> |

\*Nm = Estimado de Gene flow (flujo genético) de  $F_{st} = 0.25(1 - F_{st})/F_{st}$ .



Los valores de heterocigosis observada promedio  $H_e$  de las poblaciones fue de 0.0484 (Tabla. 8) mucho menor de lo esperado para las poblaciones de Latinoamérica de aproximadamente  $H_e$  0,40 y de África de 0,25 (22, 24), los valores de heterocigosis para cada población muestran que las poblaciones Convencionales tienen un valor de heterocigosis 0.0553 mayor que las poblaciones Orgánicas 0.0469 y Silvestre 0.0375.

Los valores de homocigosis fueron altos de 0.9516 (Tabla. 8) y el Test estadístico de Hardy-Weinberg así mismo demuestran que los loci están en equilibrio genético, es decir que la probabilidad de cambios en las estructuras de las poblaciones al nivel de locus es muy baja (Tabla. 9).

Si bien los loci esta en equilibrio de Hardy – Weinberg, es decir después de una generación mantienen las frecuencias  $p^2:2pq:q^2$ , esto no quiere decir que no exista alguna mutación o que no se este dando algún tipo de selección, sino que estas pueden estar ocurriendo a tan baja frecuencia que no se detecta una desviación de las frecuencias genotipicas de los valores esperados.



TABLA 8

**SUMARIO DE ESTADÍSTICAS DE HETEROCIGOSIS PARA TODOS LOS  
LOCI.Y COMPARACIÓN ENTRE POBLACIONES ORGÁNICAS VS  
CONVENCIONALES**

| Locus    | Num. Muest. | Obs. Hom.     | Obs. Het.     | Esp. Hom.* | Esp. Het.* | Nei**  | Med. Het. |
|----------|-------------|---------------|---------------|------------|------------|--------|-----------|
| Mf005    | 262         | 0.9542        | 0.0458        | 0.4954     | 0.5046     | 0.5027 | 0.4208    |
| Mf018    | 264         | 0.8636        | 0.1364        | 0.7616     | 0.2384     | 0.2375 | 0.2502    |
| Mf025    | 268         | 0.9328        | 0.0672        | 0.8264     | 0.1736     | 0.1730 | 0.1439    |
| Mf058    | 268         | 0.9851        | 0.0149        | 0.5634     | 0.4366     | 0.4350 | 0.3859    |
| Mf061    | 274         | 0.9854        | 0.0146        | 0.8269     | 0.1731     | 0.1724 | 0.1394    |
| Mf137    | 276         | 0.9638        | 0.0362        | 0.3458     | 0.6542     | 0.6518 | 0.5451    |
| Mf145    | 260         | 0.9692        | 0.0308        | 0.3693     | 0.6307     | 0.6283 | 0.5969    |
| Mf194    | 276         | 0.8623        | 0.1377        | 0.3849     | 0.6151     | 0.6128 | 0.4742    |
| Mf203    | 254         | 1.0000        | 0.0000        | 0.7124     | 0.2876     | 0.2864 | 0.1892    |
| Mf244    | 252         | 1.0000        | 0.0000        | 0.7406     | 0.2594     | 0.2584 | 0.2294    |
| Mean     | 265         | <b>0.9516</b> | <b>0.0484</b> | 0.6027     | 0.3973     | 0.3958 | 0.3375    |
| Dev Est. |             | 0.0511        | 0.0511        | 0.1937     | 0.1937     | 0.1930 | 0.1688    |

| Población    | Obs. Het | Dev. Est. | Esp. Het | Dev. Est. | Med. Het |
|--------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| Silvestre    | 0.0375   | 0.0461    | 0.3320   | 0.2272    | 0.3375   |
| Orgánica     | 0.0469   | 0.0664    | 0.3495   | 0.2544    | 0.3375   |
| Convencional | 0.0553   | 0.0571    | 0.4012   | 0.1665    | 0.3375   |
| Total Pobl.  | 0.0484   | 0.0511    | 0.3973   | 0.1937    | 0.3375   |

\* La homocigosis y la heterocigosis esperada fueron analizados usando Levene (1949)

\*\* Nei's (1973) heterocigosis esperada





**TABLA 9**  
**EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG**

Locus: Mf005

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 56       | 26.0000  | 34.6154               | 85.9326     |
| (B, A)    | 4        | 64.1034  | 56.3530               | -22.1936    |
| (B, B)    | 69       | 38.9004  | 23.2899               | 79.0881     |
| (C, A)    | 1        | 0.4483   | 0.6790                | 1.6047      |
| (C, B)    | 0        | 0.5479   | 0.5479                | 0.0000      |
| (C, C)    | 0        | 0.0000   | 0.0000                | 0.0000      |
| (D, A)    | 0        | 0.4483   | 0.4483                | 0.0000      |
| (D, B)    | 1        | 0.5479   | 0.3731                | 1.2034      |
| (D, C)    | 0        | 0.0038   | 0.0038                | 0.0000      |
| (D, D)    | 0        | 0.0000   | 0.0000                | 0.0000      |

Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square: 116.310465  
 Grados de libertad: 6  
 Probabilidad: 0.000000

Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg:

G-square : 145.635123  
 Grados de libertad: 6  
 Probabilidad: 0.000000

Locus: Mf018

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 105      | 98.3954  | 0.4433                | 13.6428     |
| (B, A)    | 18       | 29.4753  | 4.4675                | -17.7545    |
| (B, B)    | 8        | 2.1331   | 16.1366               | 21.1500     |
| (C, A)    | 0        | 1.7338   | 1.7338                | 0.0000      |
| (C, B)    | 0        | 0.2586   | 0.2586                | 0.0000      |
| (C, C)    | 1        | 0.0038   | 261.0038              | 11.1443     |

## Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square : 284.043704  
 Grados de libertad : 3  
 Probabilidad: 0.000000

## Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg:

G-square : 28.182652  
 Grados de libertad: 3  
 Probability : 0.000003

## Locus: Mf025

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 6        | 0.5730   | 51.3966               | 28.1828     |
| (B, A)    | 0        | 0.1348   | 0.1348                | 0.0000      |
| (B, B)    | 0        | 0.0037   | 0.0037                | 0.0000      |
| (C, A)    | 6        | 16.3820  | 6.5796                | -12.0531    |
| (C, B)    | 2        | 1.8202   | 0.0178                | 0.3767      |
| (C, C)    | 117      | 110.1236 | 0.4294                | 14.1735     |
| (D, A)    | 0        | 0.3371   | 0.3371                | 0.0000      |
| (D, B)    | 0        | 0.0375   | 0.0375                | 0.0000      |
| (D, C)    | 1        | 4.5506   | 2.7703                | -3.0305     |
| (D, D)    | 2        | 0.0375   | 102.8375              | 15.9112     |

## Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square : 164.544129  
 Grados de Libertad : 6  
 Probabilidad: 0.000000

## Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg:

G-square : 43.560753  
 Grados de Libertad : 6  
 Probabilidad: 0.000000





## Locus: Mf058

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 41       | 12.4382  | 65.5864               | 97.8096     |
| (B, A)    | 0        | 56.5094  | 56.5094               | 0.0000      |
| (B, B)    | 91       | 63.0562  | 12.3835               | 66.7637     |
| (C, A)    | 0        | 0.6142   | 0.6142                | 0.0000      |
| (C, B)    | 2        | 1.3783   | 0.2805                | 1.4893      |
| (C, C)    | 0        | 0.0037   | 0.0037                | 0.0000      |

Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square : 135.377656  
 Grados de Libertad: 3  
 Probabilidad: 0.000000

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium :

G-square : 166.062496  
 Grados de Libertad : 3  
 Probabilidad: 0.000000

## Locus: Mf061

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 123      | 112.1905 | 1.0415                | 22.6286     |
| (B, A)    | 1        | 22.7106  | 20.7547               | -6.2457     |
| (B, B)    | 12       | 1.0989   | 108.1389              | 57.3743     |
| (C, A)    | 1        | 0.9084   | 0.0092                | 0.1921      |
| (C, B)    | 0        | 0.0916   | 0.0916                | 0.0000      |
| (C, C)    | 0        | 0.0000   | 0.0000                | 0.0000      |

Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square : 130.035857  
 Grados de Libertad : 3  
 Probabilidad: 0.000000

Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg:

G-square : 73.949341  
 Grados de libertad: 3  
 Probabilidad: 0.000000





## Locus: Mf137

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 19       | 2.6945   | 98.6689               | 74.2220     |
| (B, A)    | 1        | 19.9964  | 18.0464               | -5.9911     |
| (B, B)    | 68       | 35.8909  | 28.7258               | 86.9072     |
| (C, A)    | 0        | 4.5382   | 4.5382                | 0.0000      |
| (C, B)    | 2        | 16.4073  | 12.6511               | -8.4183     |
| (C, C)    | 15       | 1.8036   | 96.5516               | 63.5474     |
| (D, A)    | 0        | 9.0764   | 9.0764                | 0.0000      |
| (D, B)    | 2        | 32.8145  | 28.9364               | -11.1909    |
| (D, C)    | 0        | 7.4473   | 7.4473                | 0.0000      |
| (D, D)    | 31       | 7.3309   | 76.4197               | 89.3970     |

## Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square: 381.061686  
 Grados de Libertad: 6  
 Probabilidad: 0.000000

## Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg:

G-square : 288.473266  
 Grados de Libertad: 6  
 Probabilidad: 0.000000

## Locus: Mf145

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 34       | 9.3243   | 65.3011               | 87.9739     |
| (B, A)    | 2        | 34.5946  | 30.7102               | -11.4022    |
| (B, B)    | 62       | 31.3822  | 29.8719               | 84.4306     |
| (C, A)    | 0        | 16.7568  | 16.7568               | 0.0000      |
| (C, B)    | 2        | 30.6409  | 26.7715               | -10.9168    |
| (C, C)    | 30       | 7.3012   | 70.5693               | 84.7899     |

## Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square : 239.980758  
 Grados de Libertad: 3  
 Probabilidad: 0.000000

## Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg:

G-square : 234.875460  
 Grados de Libertad: 3  
 Probabilidad: 0.000000



Locus: Mf194

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 9        | 1.0036   | 63.7102               | 39.4847     |
| (B, A)    | 0        | 4.1018   | 4.1018                | 0.0000      |
| (B, B)    | 19       | 3.9309   | 57.7672               | 59.8716     |
| (C, A)    | 0        | 1.4836   | 1.4836                | 0.0000      |
| (C, B)    | 0        | 2.9055   | 2.9055                | 0.0000      |
| (C, C)    | 7        | 0.4945   | 85.5754               | 37.1004     |
| (D, A)    | 0        | 0.2618   | 0.2618                | 0.0000      |
| (D, B)    | 0        | 0.5127   | 0.5127                | 0.0000      |
| (D, C)    | 0        | 0.1855   | 0.1855                | 0.0000      |
| (D, D)    | 1        | 0.0109   | 89.6776               | 9.0363      |
| (E, A)    | 3        | 1.9200   | 0.6075                | 2.6777      |
| (E, B)    | 1        | 3.7600   | 2.0260                | -2.6488     |
| (E, C)    | 0        | 1.3600   | 1.3600                | 0.0000      |
| (E, D)    | 0        | 0.2400   | 0.2400                | 0.0000      |
| (E, E)    | 9        | 0.8400   | 79.2686               | 42.6884     |
| (F, A)    | 0        | 0.1745   | 0.1745                | 0.0000      |
| (F, B)    | 0        | 0.3418   | 0.3418                | 0.0000      |
| (F, C)    | 0        | 0.1236   | 0.1236                | 0.0000      |
| (F, D)    | 0        | 0.0218   | 0.0218                | 0.0000      |
| (F, E)    | 0        | 0.1600   | 0.1600                | 0.0000      |
| (F, F)    | 1        | 0.0036   | 273.0036              | 11.2335     |
| (G, A)    | 3        | 14.0509  | 8.6914                | -9.2644     |
| (G, B)    | 8        | 27.5164  | 13.8423               | -19.7654    |
| (G, C)    | 3        | 9.9527   | 4.8570                | -7.1954     |
| (G, D)    | 1        | 1.7564   | 0.3257                | -1.1265     |
| (G, E)    | 0        | 12.8800  | 12.8800               | 0.0000      |
| (G, F)    | 0        | 1.1709   | 1.1709                | 0.0000      |
| (G, G)    | 73       | 46.8364  | 14.6155               | 64.7947     |

Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square : 719.891527  
 Grados de Libertad: 21  
 Probabilidad: 0.000000

Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg

G-square : 226.886775  
 Grados de Libertad: 21  
 Probabilidad : 0.000000





## Locus: Mf203

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 105      | 86.7391  | 3.8444                | 40.1216     |
| (B, A)    | 0        | 36.5217  | 36.5217               | 0.0000      |
| (B, B)    | 22       | 3.7391   | 89.1810               | 77.9763     |

## Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square : 129.547124

Grados de Libertad: 1

Probabilidad: 0.000000

## Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg

G-square : 118.097932

Grados de Libertad: 1

Probabilidad: 0.000000

## Locus: Mf244

| Genotypes | Obs. (O) | Exp. (E) | (O-E) <sup>2</sup> /E | 2*O*Ln(O/E) |
|-----------|----------|----------|-----------------------|-------------|
| (A, A)    | 18       | 2.5100   | 95.5957               | 70.9238     |
| (B, A)    | 0        | 0.2869   | 0.2869                | 0.0000      |
| (B, B)    | 1        | 0.0040   | 249.0040              | 11.0509     |
| (C, A)    | 0        | 30.6932  | 30.6932               | 0.0000      |
| (C, B)    | 0        | 1.7052   | 1.7052                | 0.0000      |
| (C, C)    | 107      | 90.8008  | 2.8900                | 35.1304     |

## Chi-square test de equilibrio Hardy-Weinberg:

Chi-square : 380.174916

Grados de Libertad: 3

Probabilidad: 0.000000

## Likelihood ratio test de equilibrio Hardy-Weinberg

G-square : 117.105087

Grados de Libertad: 3

Probabilidad : 0.000000





Las poblaciones con control Convencional de la enfermedad, en general mostraron más alelos únicos para esas poblaciones con relación a los encontrados en las poblaciones con controles Orgánicos y con el control Salvaje. En algunos de los locus en especial en el caso del número 8 uno de estos alelos únicos se encuentra en una de las frecuencias más altas en la población. Este dato es interesante, y demuestra que este alelo es de gran influencia en esta población. Se podría inferir, basado en el trabajo de Ware en *M. graminicola* que estos pequeños cambios en las poblaciones con sistemas de control Convencionales de la enfermedad, representan procesos individuales de mutación espontánea que podrían estar asociados a la resistencia a fungicidas. Sin embargo aunque el locus muestra un polimorfismo alto con relación a los demás loci el test estadístico de Hardy-Weinberg demuestra que las diferencias en el locus no son significantes como para pensar que un cambio, es decir una mutación puntual en este locus, pueda afectar la frecuencia alélica actual.

No se puede concluir de forma definitiva que las diferencias se deban a la presión de selección basado en el tipo de control, es decir al uso de fungicidas, o si estas mutaciones puntuales, tienen algún efecto real sobre la expresión del fenotipo de las cepas de dicha población. Sin embargo la secuenciación de uno de estos alelos únicos que se encuentran en altas frecuencias posiblemente podría mostrar cambios en la secuencia misma del

alelo que podría a su vez ser correlacionada con una presión basada en funguicidas. Este trabajo se ha realizado en otras especies como en *M. graminicola* (14).

Algunos individuos de la misma población mostraron genotipos idénticos, amplificando los mismos alelos de los 10 loci diferentes, esto y la alta tasa de individuos homocigotos podría explicarse, por el tipo de reproducción bipolar del hongo. La reproducción al azar respecto de un locus en común no es netamente universal, existen dos desviaciones de una reproducción completa al azar, una es si un individuo se recombine con otro de forma no al azar por sus grados de parentesco con un ancestro común, es decir si en una población la recombinación entre individuos emparentados se encuentra en mayor proporción, que las combinaciones casuales (con individuos no emparentados), y la segunda que los individuos puedan de alguna forma escoger su pareja por la importancia de una característica en particular (12).

En el caso de *M. fijiensis* la teoría dice que los aislados con los mismos alelos no podrían ser la progenie resultado de la reproducción sexual de sí mismos, es decir una colonia no puede autofecundarse o colonias hermanas no pueden recombinarse, debido a que sus ideomorfos no son compatibles. Los individuos homocigotos esperados en una reproducción al azar por ejemplo, corresponden mas bien al producto de la frecuencia alélica entre los



loci estudiados, y eso depende de las frecuencias de los alelos de cada locus y del número de loci estudiados (22). La posibilidad de que en la reproducción sexual de *M. fijiensis* individuos muy emparentados (colonias hermanas o clones del mismo individuo) con los mismos alelos se crucen es aun desconocida. Se sabe que los procesos de cuello de botella locales (Bottle neck) y el efecto Fundador se da en *M. fijiensis* y estos fenómenos producen estructuras irregulares en las poblaciones (22), de manera que, es muy posible que en la naturaleza se den casos de recombinación de individuos emparentados aunque esto no ha sido estudiado aun.

Como en el caso de *M. graminicola* será interesante realizar estudios dirigidos a investigar los fenómenos de la reproducción en *M. fijiensis*. Tales como la influencia de la herencia materna, la recombinación entre cepas virulentas, avirulentas, resistentes y susceptibles a fungicidas con y sin presión de selección, así como la recombinación de cepas emparentadas y clones de la misma colonia (62). Otra explicación plausible es el hecho de que como los loci no fueron diseñados específicamente para poblaciones de Ecuador, no puedan amplificar todas las posibles diferencias existentes entre los individuos de la población. Por ultimo, el tipo de muestreo no completamente al azar, tiene como desventaja que puede afectar los resultados del estudio.





Debemos recordar que los efectos fundadores pueden causar pérdida en la diversidad genética (63, 64). De hecho en el estudio del efecto Fundador hecho por Rivas se encontraron niveles de diversidad genética muy bajos en algunas de las poblaciones de África, Latino América y el Caribe. Los diferentes niveles de diversidad genética a escala continental pueden deberse a procesos recientes de recolonización o de efecto fundador, que generan excesos en la diversidad de un gen en un loci neutral selectivo, en comparación con la diversidad genética esperada de un número observado de alelos bajo equilibrio de deriva mutacional (65). En los trabajos de Rivas se encontró considerable exceso en la diversidad de algunos alelos en más de la mitad de las poblaciones estudiadas (22).

La baja diferenciación genética causada por el efecto fundador muestra indirectamente un gran porcentaje de recombinación genética es decir un flujo de genes muy alto entre las poblaciones. Si observamos las medidas indirectas del  $Nm$  en la tabla 7 veremos que los valores de flujo genético de los diferentes alelos son relativamente altos, siendo el valor de Mf025 uno de los mas altos con 5.5548, el mas bajo el valor del locus Mf244 fue de 0.8965 y el promedio de 1.4870, sin embargo es difícil precisar cuan significativos son los valores del  $Nm$  debido a que no existen parámetros definidos aun para la especie. Los valores altos del  $Fis$  0.8563 también son lo suficientemente altos en las poblaciones, como para sugerir un efecto

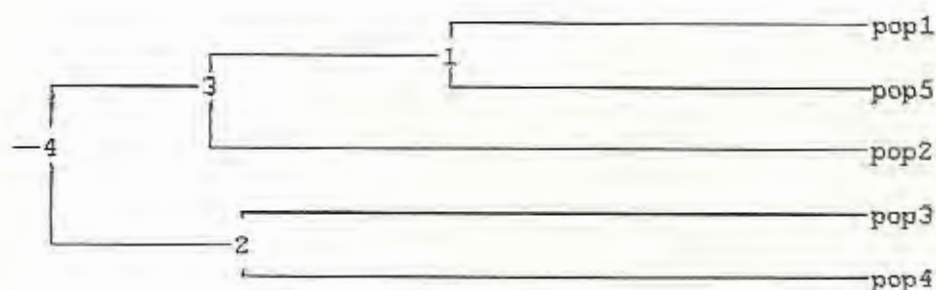
fundador (Tabla 7). Esta alta tasa de recombinación de genes, puede deberse en parte a la cercanía geográfica de las fincas consideradas en el estudio de 8km aparte la una de la otra. Dado que la distancias no superan los 500Km. valor esperado de influencia de los procesos de distribución a larga distancia causado por el viento, valor mínimo en los caso de los ciclos de extinción - recolonización (18) es de esperar que exista influencia entre las poblaciones de todo el Ecuador.

Debido a este hecho es posible que la influencia de las poblaciones entre si a nivel local sea muy alto, debido a la dispersión de las esporas por el viento en toda la zona. Otra explicación es el movimiento de los materiales contaminados entre fincas. Por ejemplo, hojas de banana en los que se empaquetan racimos de segunda calidad y que se recogen por medio de camiones entre varias fincas. Muchas de las fincas utilizan transportes comunes para el movimiento de los materiales de rechazo o de la fruta para el consumo local. Debemos acotar el hecho observado que muchos de estos transportes utilizan las hojas de banano como material de embalaje para el fruto de consumo local, esparciendo las esporas de *M. fijiensis* entre las plantaciones que recorren.



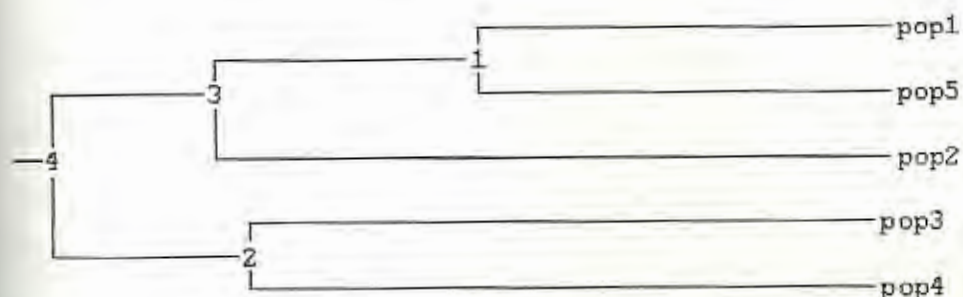


En el caso de estudio el dendrograma de Nei (Fig. 6.2 y 6.3) de distancias genéticas, muestra que existen, aunque muy pequeñas, diferencias entre las poblaciones, especialmente en lo relacionado con el tipo de control de la enfermedad utilizado. Las fincas Orgánicas son genéticamente más cercanas a las poblaciones Salvajes y las fincas Convencionales mas alejadas del control Silvestre. Esto podría demostrar la existencia de una presión de selección sobre las poblaciones del hongo causado por fungicidas en las fincas Convencionales.



| Between | And  | Length  |
|---------|------|---------|
| 4       | 3    | 1.18884 |
| 3       | 1    | 1.83752 |
| 1       | pop1 | 3.32915 |
| 1       | pop5 | 3.32915 |
| 3       | pop2 | 5.16667 |
| 4       | 2    | 1.43621 |
| 2       | pop3 | 4.91930 |
| 2       | pop4 | 4.91930 |

FIG. 6.2 DENDROGRAMA BASADO EN NEI'S (1972) GENETIC DISTANCE: METODO = UPGMA MODIFICADO POR NEIGHBOR PRODUCIDO POR PHYLIP VERSION 3.5



| Between | And  | Length  |
|---------|------|---------|
| 4       | 3    | 1.14568 |
| 3       | 1    | 1.85601 |
| 1       | pop1 | 3.09288 |
| 1       | pop5 | 3.09288 |
| 3       | pop2 | 4.94890 |
| 4       | 2    | 1.47320 |
| 2       | pop3 | 4.62137 |
| 2       | pop4 | 4.62137 |

| Población | Nombre                     | Tipo de Control | Localidad      |
|-----------|----------------------------|-----------------|----------------|
| pop 1     | Silvestre (W - 1)          | Ninguno         | Mariscal Sucre |
| pop 2     | Balao Orgánico(BO - 2)     | Orgánico        | Balao          |
| pop 3     | Balao Convencional(BC- 3)  | Convencional    | Balao          |
| pop 4     | Taura Convencional(TC - 4) | Convencional    | Taura          |
| pop 5     | Taura Orgánico (TO - 5)    | Orgánico        | Taura          |



FIG. 6.3 DENDROGRAMA BASADO EN NEI'S (1978) GENETIC DISTANCE: METHOD = UPGMA MODIFICADO POR NEIGHBOR PRODUCIDO POR PHYLIP VERSION 3.5

La distancia física entre las haciendas de la zona de Balao es de 8,24Km aproximadamente y la distancia entre esta zona y el control es de 90km. La distancia entre las fincas situadas en la zona de Taura es de 7Km y la distancia de la zona de Taura con el control es de 32,87Km. Es interesante notar que la población mas alejada genéticamente del control es la población C4 es decir la población con control Convencional de la zona de Taura. Ya que la distancia que existe entre estas poblaciones y el control no es la



suficiente para evitar la recombinación, es de esperar que las poblaciones de la zona de Taura fueran las mas cercanas en sus estructuras genéticas de población al control, por la poca distancia física entre ellas, sin embargo como muestra el dendrograma (Fig. 2 y 3), las poblaciones bajo sistema de control orgánico son las mas parecidas al control a diferencia de las poblaciones bajo el sistema de control Convencional. Esto muestra que el sistema de control ejerce presión sobre las poblaciones del patógeno.

Gracias a la alta tasa de recombinación y flujo genético estas diferencias se diluyen entre las poblaciones manteniendo la frecuencia de los alelos naturales en equilibrio, de manera que las poblaciones de las fincas Orgánicas y las poblaciones salvajes, actúan como una especie de tampón que reduce la distribución de nueva información genética, reduciendo la dispersión de posibles alelos mutantes de resistencia, esto si asumimos que la recombinación es totalmente al azar, y que las probabilidades de recombinación de cepas susceptibles y resistentes a la acción de fungicidas se debe en proporción de 1:1 en los diferentes aislados. Estudios en *Mycosphaerella graminicola* podrían mostrar que en la naturaleza esto no es del todo cierto (14).



Es importante resaltar el hecho que la resistencia a las nuevas moléculas antifúngicas esta aumentando a un ritmo acelerado. Entre las clases de fungicidas más recientes utilizados para el control de *Sigatoka* negra se encuentran las estrobirulinas. Trabajos en *Mycosphaerella graminicola* han mostrado cómo la reproducción sexual ha contribuido a la fijación de la mutación en las poblaciones del hongo para darle resistencia a las estrobirulinas (66).

Como el sitio de enlace de las estrobirulinas es mayormente en la mitocondria, es lógico pensar que los alelos de resistencia a estos fungicidas se deben básicamente al aporte del tipo de acoplamiento materno, ya que este organelo en particular es de exclusiva herencia materna (67, 68). Por lo tanto se sugiere realizar un estudio poblacional pero utilizando el DNA mitocondrial para evaluar las diferencias.

Los trabajos en *Mycosphaerella graminicola* desarrollados por Ware demostraron el importante papel de la reproducción sexual en la resistencia. En primer lugar se observo sorpresivamente que todos los cruces de las diferentes cepas en las semillas de trigo pretratadas con diferentes dosis de Amistar<sup>TM</sup> (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 y 200 % de azoxystrobin) obtuvieron descendencia, indicando que el azoxystrobin en una amplia variedad de dosis es incapaz de evitar la recombinación de las cepas (14).



Los datos de Ware demuestran que al parecer el estrés causado por las estrobirulinas estimula la preferencia de acoplamiento de las cepas resistentes del tipo materno del patógeno, de manera que las cepas sensibles al fungicida actúan como donadores paternos. Este hecho aceleraría la distribución de la resistencia después del evento inicial de mutación, que probablemente ocurre en una frecuencia muy alta. Este mecanismo podría ser responsable de la rápida dispersión de la resistencia a las estrobirulinas por *M. fijiensis* en Costa Rica (69, 70).

Otro dato interesante es que la influencia materna en las poblaciones en estado natural, esto es sin ninguna presión de selección debería ser normalmente en probabilidad de 1:1 ya que cada aislado paterno tiene la misma oportunidad de producir estructuras tanto femeninas como masculinas y el acoplamiento se supone que es un proceso al azar (71, 72). Sin embargo en el trabajo de Ware se observó que inclusive en las cepas utilizadas como control la herencia materna no cumplía con la probabilidad de 1:1, indicando que la donación materna del material genético es realmente variable a través de los procesos de presión de selección, por aun no determinados factores ambientales e independientes del hospedero. Lo cual significa que las poblaciones con el alelo mutante primero se comportan en la

mayor parte de los casos durante el proceso de reproducción sexual como hembras heredando el alelo mutante de resistencia a toda la siguiente generación de ascosporas. Segundo, independiente de los factores ambientales como temperatura, humedad y otros todavía no estudiados, la población mutante es capaz de sobrevivir aun bajo la aplicación de funguicidas en forma tal que las poblaciones del hongo resistentes al funguicida permanecen dominantes en los monocultivos de banana

Aunque las diferencias en dispersión de *M. graminicola* y *M. fijiensis* son considerables, ya que a diferencia de *M. fijiensis* las esporas de *M. graminicola* pueden transportarse en las semillas de su hospedero, es interesante considerar la similitud de los mecanismos de reproducción y de resistencia de ambas especies. Aunque en este caso la distribución de *M. fijiensis* es algo más lenta, probablemente la posible resistencia al control que se da en el campo estará explicada por el mismo modelo de recombinación sexual.

Otro punto interesante, es el hecho que la mayoría de las variedades de *Musa* utilizadas en el campo son susceptibles a la enfermedad, estudios en *M. graminicola* han demostrado que aun en un hospedero resistente los genes de avirulencia de una cepa de *M. graminicola* no evitan la



recombinación genética con una cepa virulenta a ese hospedero en particular (14), de manera que es de esperar que aun con la implementación en las haciendas bananeras de variedades tolerantes o resistentes a Sigatoka negra será difícil frenar la recombinación con cepas virulentas a esas variedades.

En el trabajo de Ware los aislados avirulentos de *M. graminicola* en cultivares resistentes, no provocaron la hipersensibilidad (73), el efecto esperado de una interacción gen a gen (74), entre el gen de una cepa avirulenta de un patógeno y su correspondiente gen de resistencia de una variedad del hospedero resistente. Esto provoco que las cepas avirulentas produjeran suficiente biomasa como para lograra la recombinación sexual con las cepas resistentes del patógeno. Interesante en el caso de estas cepas avirulentas fue el hecho de su imposibilidad para reproducirse de manera asexual sobre los cultivares resistentes (14).

Una herramienta útil para la identificación de los genes que provocan la expresión fenotípica, es el mapeo genético de las especies (75) y su total secuenciación. Los mapas genéticos nos permiten analizar las distancias aproximadas entre los genes que controlan alguna característica particular en los cromosomas. Por obvias razones son sumamente útiles al estudiar la

distribución de alelos en la progenie y la identificación de los alelos responsables de una característica como la resistencia. Este es el caso de *M. graminicola*, en la cual ya se han desarrollado tanto un mapa genético como muestran los trabajos de Ware y también su completa secuenciación. Al tener un ancestro común como especie de *Mycosphaerella* la comprensión de dicho genoma es un salto enorme en la comprensión de muchos procesos relacionados en *M. fijiensis*.

Dicho de esta manera en el caso de las especies de *Mycosphaerella*, lo más probable es que las estrategias de reproducción sexual, sean las más efectivas para la dispersión efectiva de alelos mutantes de resistencia y virulencia entre las cepas de las poblaciones. Si bien es cierto que la frecuencia alélica de las pequeñas variaciones encontradas (Fig. 2 y 3) en el presente estudio son en su mayoría muy bajas, cabe la posibilidad que las sucesivas generaciones del patógeno y la recombinación selectiva que podría darse en este caso, ayuden a la rápida dispersión de estos alelos mutantes que bien podrían ser los alelos de resistencia a fungicidas. El presente estudio de diferenciación genética de *M. fijiensis* es el inicio de la investigación de las poblaciones del resto del País, siendo el primer paso para el entendimiento de los procesos de dispersión de la enfermedad que nos ayudaran a ver la necesidad de implementar medidas de cuarentena y a la planificación de mejores sistemas de control.



# CAPÍTULO 7

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES:

1. Los pocos alelos encontrados por loci y la poca diferenciación genética a escala geográfica local demuestran la existencia del efecto fundador. Los valores altos de *F<sub>is</sub>* muestran un alto inbreeding en las poblaciones, y este hecho corrobora la existencia del efecto Fundador sobre las poblaciones del País reflejando la dispersión estocástica del patógeno en áreas tropicales. El rango de dispersión de *M. fijiensis* es el resultado de tanto la dispersión por esporas de unos cientos de kilómetros así como del movimiento de material infectado, sin embargo la importancia relativa de estas formas de dispersión no pudo ser determinada.

2. Los valores de  $F_{st}$  demostraron que existe una diferenciación moderada entre las poblaciones de haciendas Orgánicas vs haciendas de control Convencional. Esto sugiere la existencia de la presión diferencial ejercida por el tipo de control aplicado.
  
3. Aunque el estimado del flujo de genes contemporáneos entre las poblaciones del patógeno en este trabajo es indirecto, muestra la alta tasa de migración y recombinación genética entre las poblaciones estudiadas. Los altos valores de  $Nm$  muestran posiblemente la dominancia que ejercen algunos alelos sobre otros. Posiblemente alelos dominantes se relacionen con la presión de selección del control con fungicidas.
  
4. Las poblaciones Orgánicas son genéticamente más cercanas a la población Silvestre que la distancia de las poblaciones Convencionales con las Silvestres. Este resultado sugiere que la presión de los químicos y en este caso de las estrobirulinas las más utilizadas, podrían de alguna manera estar contribuyendo a la divergencia de las poblaciones Convencionales vs las Silvestres.



5. Los resultados experimentales mostraron poca variabilidad a diferencia de lo esperado para las poblaciones de *M. fijiensis*. Este hecho se debe posiblemente a la relativamente corta distancia geográfica entre las zonas de estudio, así como también al reducido número de muestras por población.
  
6. No es posible saber con certeza mediante la caracterización genética el flujo de un alelo mutante de linaje materno en particular, solo las diferencias entre individuos de una población, su relación parental y la diferencia genética con relación a otras poblaciones. Será necesario considerar en el futuro el estudio particular de un modelo de recombinación sexual entre las cepas resistentes y susceptibles de *M. fijiensis* para dilucidar los mecanismos de resistencia del patógeno y la forma de distribución de la resistencia a fungicidas de la enfermedad en nuestro País.
  
7. No hay certeza que dentro de las secuencias de microsatélites pueda existir mutaciones o cambios en un solo par de bases, por lo que para futuros estudios sería bueno secuenciar los fragmentos de ADN amplificados.

**RECOMENDACIONES:**

1. El estudio de esta tesis se realizó con microsatélites aislados de poblaciones de *M. fijiensis* provenientes de África. Se recomienda diseñar microsatélites basados en las poblaciones Silvestres de Ecuador.
2. Se deberían incluir zonas aisladas de la influencia de los controles Convencionales, para analizar las estructuras genéticas de las poblaciones Silvestres. Las zonas libres de control químico ayudan a mantener las frecuencias alélicas originales de las poblaciones fundadoras, y así se podrá tener un mejor parámetro de comparación con los cambios que se puedan dar en poblaciones sujetas a presiones de selección.
3. Para establecer la interacción de las poblaciones existentes, deberían ser consideradas en un estudio poblacional, todas las principales zonas bananeras del Ecuador, establecer correlaciones entre las características climáticas de las diferentes zonas geográficas y determinar el efecto del tipo(s) de molécula(s) de control usado, y por ultimo el estudio deberá analizar las poblaciones durante un periodo de tiempo suficientemente largo (basado en el número de generaciones anuales de *M. fijiensis*) para verificar el equilibrio de los





alelos de las poblaciones. El muestreo de dichos estudios debería ser totalmente al azar, recolectando las muestras de la población en una distribución que abarque toda la zona de estudio y no solo los focos de infección.

4. Sería necesario un estudio dirigido a la identificación de los genes de resistencia a fungicida y de virulencia de *M. fijiensis*, por lo que debería ser necesaria la secuenciación de los fragmentos de ADN que demuestran polimorfismo. Como probablemente la resistencia a estrobirulinas es heredada por la influencia materna en la mitocondria, es necesario un estudio específico de la información genética que se encuentra en el ADN de dicho organelo.
5. Una herramienta útil para la identificación de estos genes en particular y de otros importantes, sería el mapeo genético del genoma de *M. fijiensis* y por supuesto su total secuenciación, sería una de las mejores herramientas para el análisis de los mecanismos de resistencia y agresividad.
6. Dado que se ha desarrollado el análisis de las diferencias genéticas por medio de microsatélites, se debería instalar un sistema de cuarentena basada en esta herramienta molecular, para evitar la

entrada de *M. fijiensis* con nuevos alelos relacionados posiblemente con virulencia.

7. Para el sector Bananero el análisis de las poblaciones de sus haciendas mediante microsátélites, podría darles una idea de la influencia que ejercen sobre su población, las poblaciones del patógeno proveniente de haciendas vecinas. El conocimiento de cómo una población divergente puede recombinarse con la local y posiblemente pasar la resistencia a una determinada presión, ocasionando posibles problemas en el manejo de la población local. Este conocimiento ayudaría a la elaboración estrategias de manejo y cuarentena dirigidas a tratar de reducir esta influencia, o a prever futuras acciones de control sobre la resistencia.



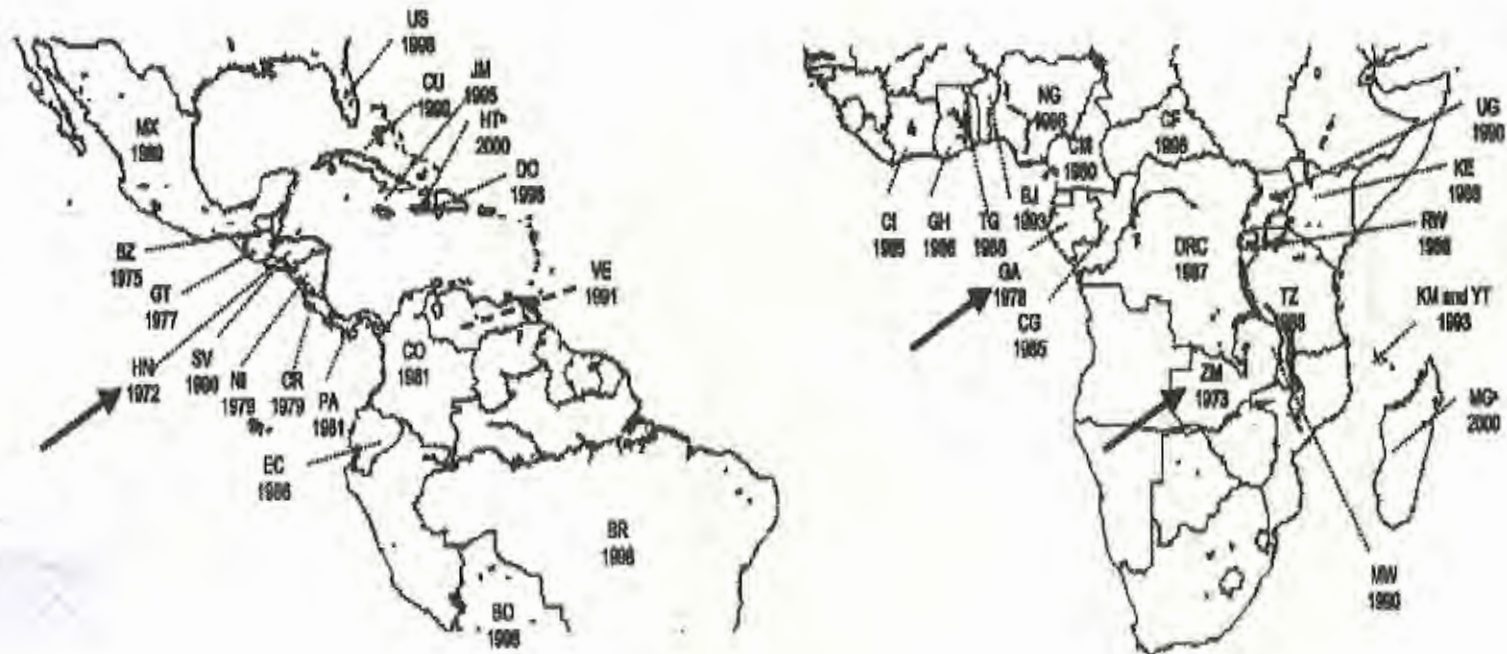


# APÉNDICES



## Apéndice A

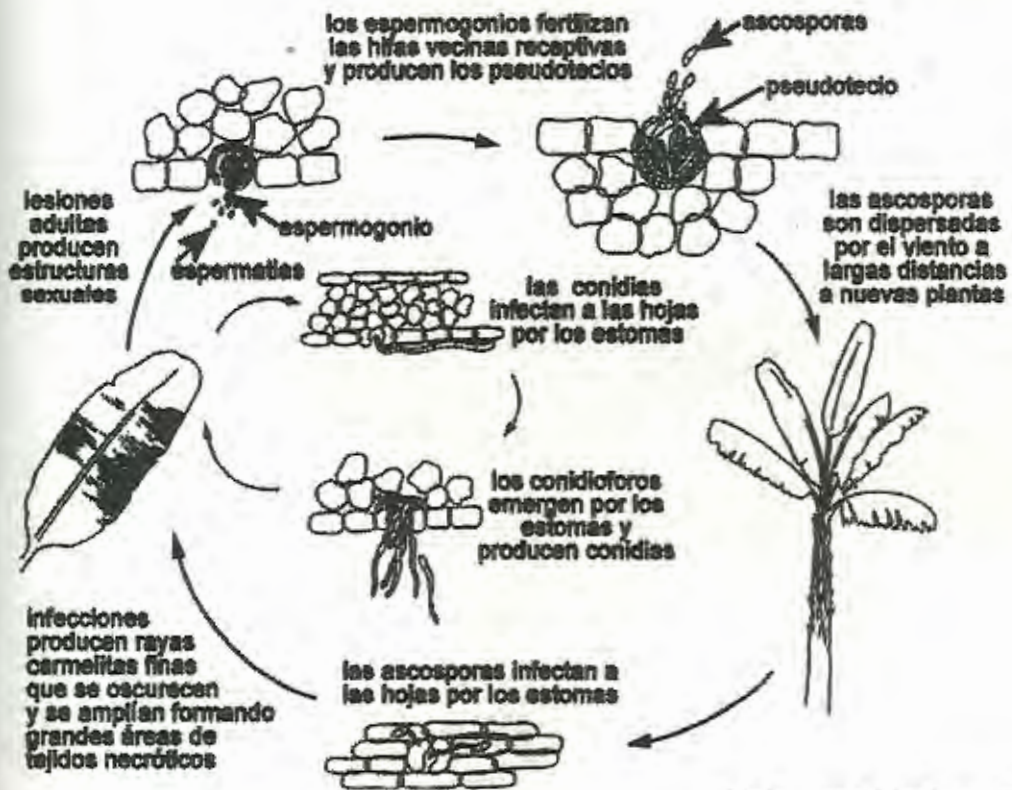
Dispersión de *Mycosphaerella fijiensis*. Este un hongo Ascomiceto, tuvo su centro de origen localizado en el Sudeste de Asia, se identifico en Latino América en 1972, en Honduras, esparciéndose al norte hacia Florida y al sur llegando a Brasil en 1998. En el Caribe, *M. fijiensis* fue observada primeramente en Cuba en 1990 y subsecuentemente en Jamaica, La Republica Dominicana y más recientemente en Haití. No se ha informado de su presencia en el resto de las islas del Caribe. El reporte mas temprano en África fue en Zambia en 1973 pero aun no esta confirmado. El primer reporte confirmado oficialmente fue en Gabón en 1978 esparciéndose a lo largo de la costa oeste a Côte d'Ivoire. La enfermedad está presente en el Congo y se esparció hacia el este probablemente vía La Republica Democrática del Congo a Kenya. Ha sido detectada también en Malawi, Las Islas Comoro y recientemente en Madagascar. *M. fijiensis* llegó a Ecuador en 1986. Tomado de Rivas et al. 2004.





## Apéndice B

### Ciclo de reproducción Sexual y Asexual de *Mycosphaerella Fijiensis*.



## Apéndice C

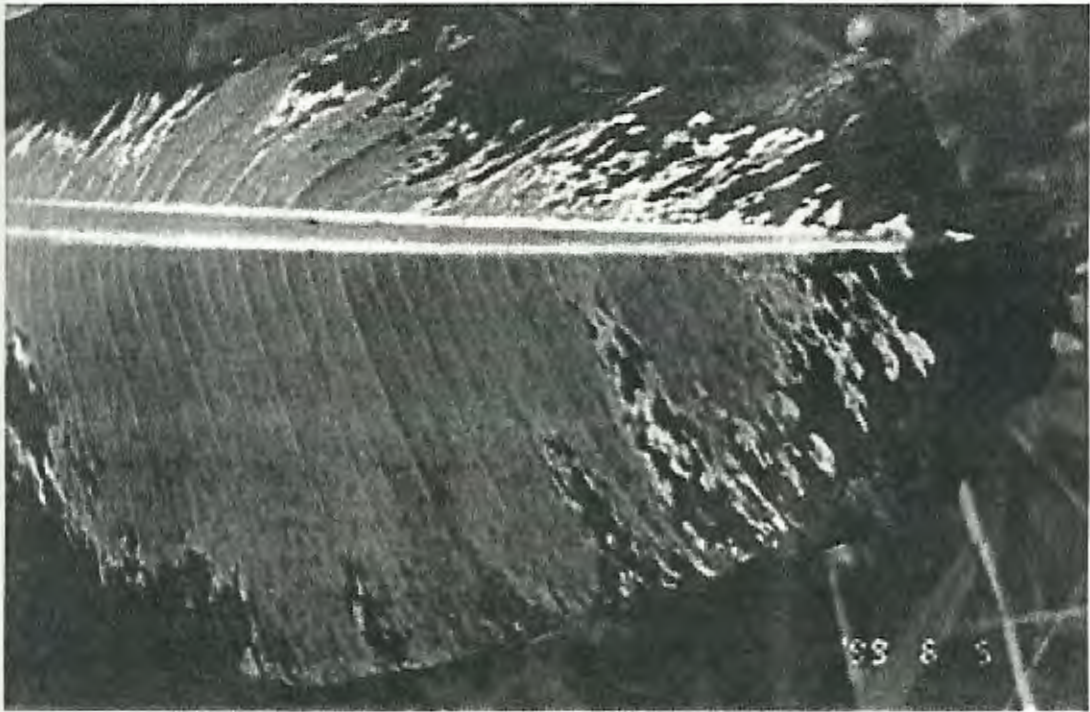
Método de numeración de las hojas de banano  
(Adaptado de Carlier, 2002)





Apéndice D

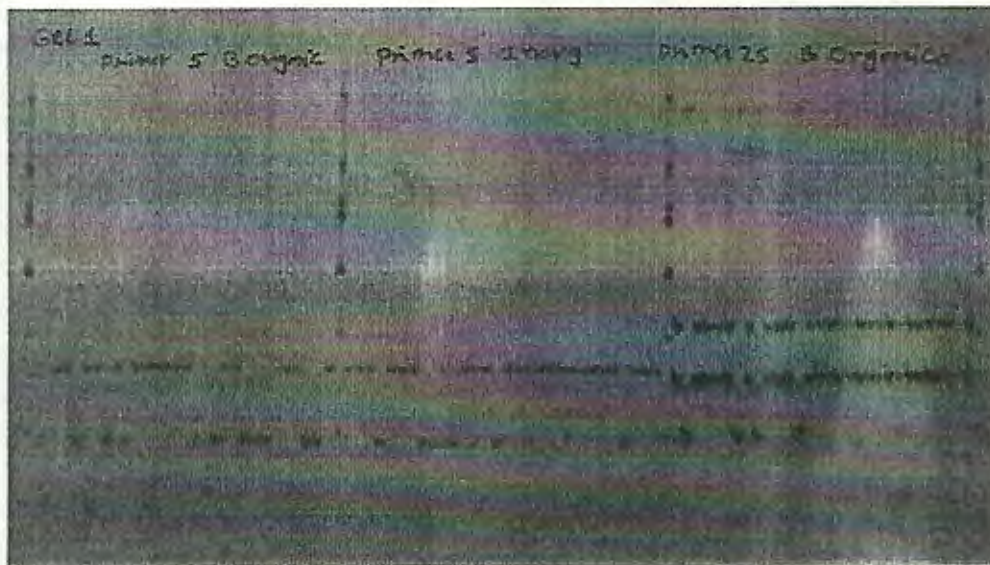
Hoja con los síntomas característicos de la enfermedad.



## Apéndice E

Comparación por medio de Gel de Poliacrilamida de microsatélites de *M. fijiensis* tomadas de la zona de a) Balao Provincia del Guayas, con tratamientos de control diferenciales y b) Salvaje.

a)



b)





## Apéndice F

Datos obtenidos de la medición en pares de bases de los fragmentos de ADN amplificados a partir de las muestras extraídas de las poblaciones por migración en geles de poliacrilamida

### W - 1 población Silvestre

| Primer 5 | Primer 18 | Primer 25 | Primer 58 | Primer 61 | Primer 137 | Primer 145 | Primer 194 | Primer 203 | Primer 244 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 200        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 200        |
| 183      | 0         | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 0          | 200        |
| 183      | 0         | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 0          | 200        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 273        | 234        | 205        |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 276        | 0          | 0          |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 276        | 0          | 0          |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 0          | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 0          | 234        | 205        |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 0          | 234        | 0          |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 0          | 234        | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 190       | 166       | 111       | 239        | 188        | 276        | 234        | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 276        | 234        | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 124       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 124       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 226        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 226        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 0          | 200        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 0          | 200        |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 111       | 0          | 0          | 294        | 0          | 0          |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 111       | 0          | 0          | 294        | 0          | 0          |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 0          | 294        | 0          | 0          |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 0          | 294        | 0          | 0          |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 200        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 200        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 108       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 108 | 179 | 175 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 108 | 179 | 167 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 0   | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 0   | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 108 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 0   | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 0   | 234 | 205 |
| 151 | 108 | 179 | 175 | 111 | 229 | 0   | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 108 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 276 | 234 | 205 |
| 151 | 108 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 276 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 0   | 229 | 176 | 294 | 234 | 0   |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 0   | 229 | 176 | 294 | 234 | 0   |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 0   | 276 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 0   | 276 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 294 | 234 | 200 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 294 | 234 | 200 |
| 158 | 104 | 176 | 166 | 124 | 243 | 181 | 294 | 227 | 215 |

**BO - 2 población localidad Balao control Orgánico**

| Primer 5 | Primer 18 | Primer 25 | Primer 58 | Primer 61 | Primer 137 | Primer 145 | Primer 194 | Primer 203 | Primer 244 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 155       | 0         | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 155       | 0         | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 183      | 108       | 179       | 167       | 111       | 231        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 231        | 176        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 231        | 176        | 273        | 234        | 205        |
| 183      | 108       | 179       | 167       | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 108       | 155       | 167       | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 155       | 167       | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 108       | 155       | 167       | 111       | 229        | 174        | 294        | 237        | 205        |
| 183      | 103       | 155       | 167       | 111       | 229        | 174        | 294        | 237        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 231        | 176        | 294        | 234        | 205        |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 174 | 273 | 237 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 174 | 273 | 237 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 155 | 167 | 111 | 231 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 155 | 167 | 111 | 231 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 0   | 167 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 0   | 167 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 124 | 231 | 176 | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 124 | 231 | 176 | 273 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 231 | 176 | 273 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 231 | 176 | 273 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 229 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 229 | 174 | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 155 | 167 | 111 | 231 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 155 | 167 | 111 | 231 | 176 | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 108 | 179 | 167 | 124 | 231 | 174 | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 124 | 229 | 174 | 273 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 294 | 0   | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 294 | 0   | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 0   | 111 | 229 | 0   | 280 | 0   | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 0   | 111 | 229 | 0   | 280 | 0   | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 292 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 176 | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 176 | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 108 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 273 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 273 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 273 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 273 | 234 | 205 |
| 158 | 104 | 176 | 166 | 124 | 243 | 181 | 294 | 227 | 215 |









|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 183 | 103 | 179 | 0   | 111 | 229 | 176 | 292 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 0   | 111 | 229 | 176 | 289 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 0   | 111 | 229 | 176 | 289 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 292 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 292 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 292 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 292 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 0   | 111 | 229 | 174 | 289 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 0   | 111 | 229 | 174 | 270 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 292 | 237 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 270 | 237 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 229 | 174 | 270 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 229 | 174 | 270 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 270 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 270 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 229 | 188 | 289 | 234 | 200 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 229 | 188 | 289 | 234 | 200 |
| 158 | 104 | 176 | 166 | 124 | 243 | 181 | 294 | 227 | 215 |

**TC - 4 población localidad Taura control Convencional**

| Primer 5 | Primer 18 | Primer 25 | Primer 58 | Primer 61 | Primer 137 | Primer 145 | Primer 194 | Primer 203 | Primer 244 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 0        | 108       | 179       | 166       | 111       | 226        | 174        | 273        | 237        | 205        |
| 0        | 103       | 179       | 166       | 111       | 226        | 174        | 273        | 237        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 276        | 237        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 276        | 237        | 205        |
| 0        | 103       | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 276        | 237        | 200        |
| 0        | 103       | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 276        | 237        | 200        |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 200        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 200        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 124       | 229        | 176        | 276        | 234        | 200        |
| 151      | 103       | 155       | 167       | 124       | 229        | 176        | 276        | 234        | 200        |
| 151      | 120       | 179       | 167       | 111       | 226        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 120       | 155       | 167       | 111       | 226        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 226        | 174        | 294        | 237        | 205        |
| 151      | 103       | 155       | 166       | 111       | 226        | 174        | 294        | 237        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 237        | 200        |
| 151      | 103       | 155       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 237        | 200        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 124       | 229        | 176        | 294        | 237        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 124       | 229        | 176        | 294        | 237        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 124       | 229        | 176        | 294        | 237        | 200        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 124       | 229        | 176        | 294        | 237        | 200        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 203        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 203        |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0   | 103 | 179 | 166 | 124 | 229 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 0   | 103 | 179 | 166 | 124 | 229 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 294 | 234 | 200 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 294 | 234 | 200 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 294 | 237 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 276 | 237 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 111 | 229 | 176 | 294 | 234 | 200 |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 111 | 229 | 176 | 276 | 234 | 200 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 294 | 234 | 200 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 239 | 188 | 294 | 234 | 200 |
| 0   | 103 | 0   | 167 | 124 | 229 | 176 | 294 | 237 | 205 |
| 0   | 103 | 0   | 167 | 124 | 229 | 176 | 276 | 237 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 124 | 239 | 188 | 294 | 0   | 0   |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 124 | 239 | 188 | 276 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 0   | 234 | 205 |
| 0   | 0   | 179 | 167 | 111 | 229 | 0   | 0   | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 124 | 229 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 158 | 167 | 124 | 229 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 108 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 294 | 237 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 111 | 229 | 176 | 294 | 237 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 124 | 226 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 167 | 124 | 226 | 176 | 294 | 234 | 205 |
| 0   | 0   | 179 | 167 | 111 | 239 | 174 | 294 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 179 | 167 | 111 | 239 | 174 | 294 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 0   | 167 | 111 | 229 | 188 | 294 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 0   | 167 | 111 | 229 | 188 | 294 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 0   | 167 | 0   | 0   | 176 | 294 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 0   | 167 | 0   | 0   | 176 | 294 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 294 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 294 | 0   | 0   |
| 183 | 103 | 0   | 167 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 183 | 103 | 0   | 167 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 0   | 0   | 111 | 226 | 174 | 273 | 0   | 0   |
| 0   | 0   | 0   | 0   | 111 | 226 | 174 | 273 | 0   | 0   |
| 151 | 0   | 0   | 167 | 111 | 226 | 174 | 0   | 0   | 200 |
| 151 | 0   | 0   | 167 | 111 | 226 | 174 | 0   | 0   | 200 |
| 158 | 104 | 176 | 166 | 124 | 243 | 181 | 294 | 227 | 215 |





TO - 5 población localidad Taura control Orgánico

| Primer 5 | Primer 18 | Primer 25 | Primer 58 | Primer 61 | Primer 137 | Primer 145 | Primer 194 | Primer 203 | Primer 244 |
|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
|          | 108       | 179       | 166       | 111       | 226        | 174        | 294        | 234        | 205        |
|          | 103       | 155       | 166       | 111       | 226        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 226        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 226        | 174        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 273        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 273        | 234        | 205        |
| 151      | 108       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 273        | 234        | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 273        | 234        | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 0          | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 0          | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 273        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 167       | 111       | 239        | 188        | 273        | 234        | 205        |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 273        | 0          | 0          |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 273        | 0          | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 294        | 234        | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 239        | 188        | 273        | 234        | 205        |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 0          | 234        | 0          |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 0          | 234        | 0          |
| 183      | 0         | 0         | 167       | 0         | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          |
| 183      |           |           | 167       | 0         | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          |
| 265      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 0          | 205        |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 229        | 176        | 294        | 0          | 205        |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 0          | 0          | 0          | 0          |
| 0        | 0         | 155       | 166       | 0         | 0          | 0          | 0          | 234        | 205        |
| 0        | 0         | 155       | 166       | 0         | 0          | 0          | 0          | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 226        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 226        | 174        | 294        | 234        | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 226        | 174        | 294        | 0          | 205        |
| 151      | 103       | 179       | 167       | 111       | 226        | 174        | 294        | 0          | 205        |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 174        | 294        | 0          | 0          |
| 0        | 0         | 0         | 0         | 0         | 0          | 174        | 294        | 0          | 0          |
| 0        | 0         | 179       | 166       | 0         | 226        | 0          | 0          | 237        | 0          |
| 0        | 0         | 155       | 166       | 0         | 226        | 0          | 0          | 237        | 0          |
| 183      | 103       | 179       | 166       | 111       | 238        | 188        | 294        | 234        | 205        |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 238 | 188 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 239 | 188 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 239 | 188 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 239 | 188 | 294 | 0   | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 239 | 188 | 294 | 0   | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 124 | 229 | 176 | 0   | 234 | 0   |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 124 | 229 | 176 | 0   | 234 | 0   |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 0   |
| 151 | 103 | 179 | 167 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 0   |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 103 | 179 | 166 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 239 | 188 | 294 | 234 | 205 |
| 183 | 103 | 179 | 166 | 111 | 239 | 188 | 294 | 234 | 205 |
| 202 | 102 | 179 | 167 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 151 | 102 | 179 | 167 | 111 | 226 | 174 | 294 | 234 | 205 |
| 158 | 104 | 176 | 166 | 124 | 243 | 181 | 294 | 227 | 215 |

\*Secuencia esperada según el autor (Neu C. et al 1999).







## BIBLIOGRAFÍA

- 1) FAO Accessed on the Internet at –2000– <http://www.inibap.org/network/tabexpor.html>
- 2) Mobambo K., Gauhl F., Vuylsteke D., Ortiz R., Pasberg – Gauhl C. And Swennen R. Yield loss in plantain from black Sigatoca leaf spot and fieldperformance of resistant hybrids. Filed Crops Res. 35, 1993. pp 35 – 42.
- 3) SICA, Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganaderia del Ecuador. Base de datos del III Censo Nacional Agropecuario. 2004. [on line]. Available at <http://cna.sica.gov.ec/listado.htm> [accessed on 1/04/2005].
- 4) Arias P., Dankers C., Liu P. and Pilkaus P.. The World banana economy. 1985 – 2002. Accessed on the internet <http://www.fao.org?> 2003.
- 5) Roux N., Toloza A., Busogoro J., Panis B., Strosse H., Lepoivre P., Swennen R. and Zapata-Arias F. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. In: *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas:

present status and outlook. Proceedings of the workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, Costa Rica on 20-23 May 2002.

- 6) Sierotzki H., Parisi S., Steinfeld U., Tenzer I., Poirey S., Gisi U. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc<sub>1</sub> enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. Pest Management Science 2000a, 56: 833 – 841
- 7) Hayden H., Carlier J. and Aitken E. "Genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* populations from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands" Plant Pathology 2003. Vol. 52, Issue 6, Page 703-712.
- 8) Jiménez M. Organic banana production in Ecuador: its implication on black Sigatoka development and plant – soil nutritional status. RAFS Editorial Cambridge University Press. United Kingdom. 2007
- 9) Vázquez G. Ecología y la formación ambiental. México: McGraw Hill. 1993.
- 10) Futuyma D. Evolutionary Biology Third Edition, Sinauer Associates, Inc. printed in Massachusetts, USA 1998. Chapter .4: 67 – 69
- 11) Smith R. "Ecology and field biology". 1<sup>st</sup>. Edition. New York: Harper & Row. 1980.





- 12) Griffiths A., Millar J., Suzuki D., Lewontin R., Gelbart W., "An Introduction to Genetic Analysis" Sixth edition W.H. FREEMAN AND COMPANY NEW YORK 1996. Chapter 1: 14; 26: 792,793, 791 – 799.
- 13) Smith R. "Ecology and field biology". 3<sup>Th</sup>. Edition New York: Harper Collins. 1996
- 14) Ware S., Diaz – Trujillo C., Kema G., van der Lee T., de Waard M. Aspects of sexual reproduction in *Mycosphaerella* species on wheat and barley: genetic studies on specificity, mapping, and fungicide resistance. PhD thesis Wageningen University, The Netherlands, 2006. ISBN 90-8504-527-4 Chapter 2: 34, Chapter 5: 102 – 104; 114 – 119.
- 15) Brent K. "FUNGICIDE RESISTANCE IN CROP PATHOGENS: HOW CAN IT BE MANAGED?" Publicado por GCPF (Brusselas), FRAC Monografía No.1 ISBN 90-72398-07-6, Pág. 13 - 14 impreso en el Reino Unido Dept. legal: D/1995/2537/1, Abril 1995.
- 16) Wiggins T., Jager B. Mode of action of the new methoxyacrylate antifungal agent ICIA 5504. Biochemical Society Transactions 1994. Chapter 22: 68S
- 17) Sierotzki H., Wullschleger J., Gisi U. Point mutation in cytochrome *b* gene conferring resistance to strobilurin fungicides in *Erysiphe*



- graminiis f. sp tritici* field isolates. Pesticide Biochemistry and Physiology 2000b. Chapter 68: 107 – 112.
- 18) Brown J., Hovmøller M. Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on PLant Disease. Science, 2002. Vol. 297 Issue 5581, p537, 5p, 3 maps.
- 19) Gage S., Isard S., Colunga-Gaecia M. Agric. For. Meteorol. 1999. Chapter 97, 249
- 20) Monaco L., Ann. N.Y. Acad. 1977 Sci. 287,57
- 21) Stover R., Simmonds N. Bananas (Longman, London, ed 3) 1987
- 22) Rivas G., Zapater M., Abadie C. and Carlier J. "Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of banana *Mycosphaerella fijiensis*". Molecular Ecology 2004. Vol 13, Issue 2, Pág. 471.
- 23) Souza A., Silva C., y Ferreira A. Sex in fungi: lessons of gene regulation. Genet. Mol. Res. 2003. Chapter 2 (1): 136-147.
- 24) Carlier J., Lebrun M., Zapater M., Dubois C. and Mourichon X. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus *Mycosphaerella fijiensis*. Molecular Ecology 1996. Chapter 5, 499-510.
- 25) Crous P. *Mycosphaerella spp. And their anamorpha associated with leaf spot diseases of Eucalyptus*. Mycologia Memoir 1998. Chapter 21: 1 – 170.





- 26) Vucetich J. and Waite T. "Erosion of heterozygosity in fluctuating populations". *Conservation Biology* 1999. Chapter 13(4):860-868.
- 27) Haldane J. "The Origin of Life". *New Biol.* 1954. Chapter 16, 12-16.
- 28) Nei M. "Estimation of Average Heterozygosity and Genetic distance from a Small number of Individuals." Center for Demographic and Population Genetics, University of Texas at Houston, Texas 77025, *Genetics* 1978. Chapter 89, 583 - 589.
- 29) Gregorius H-R. "The relationship between the concepts of genetic diversity and differentiation". *Theor. Appl. Genet.* 1987 Chapter 74: 397-401.
- 30) Jones D., Alcom J. "Freckle and Black Sigatoka diseases of banana in Far North Queensland". *Australasian Plant Pathology* 1982. Chapter 11, 7 - 9.
- 31) Johnston A. Spread of Banana Black Leaf Streak. FAO Plant Protection Committee for the South East Asia and Pacific Region. Information Letter No. 41, Bangkok, Thailand, 2 pp. 1965.
- 32) Pérez, Graham K. A simple way to distinguish black leaf streak from Sigatoka disease on bananas. *Bulletin of the Department of Agriculture, Fiji* 1969. Chapter 49,4.
- 33) Meredith D. and Lawrence J. Black leaf disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*). Symptoms of disease in Hawaii, and



- notes on the conidial state of causal fungus. Transactions of the British Mycological Society 1969. Chapter 52, 459-476.
- 34) Stover R. and Dickson Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var. *difformis*. A comparison of the first Central American epidemics. FAO Plant Protection bulletin 1976. Chapter 24, 36-42.
- 35) Buddenhagen I. "Disease susceptibility and genetics in relation to breedings of banana and plantain". In: Persley, G.J. and De Lange, E.A.; "Banana and Plantain breeding strategies". Proceedings of an international workshop held at Cairns, Australia, 13 – 17 October 1986. ACIAR, pp: 95 – 109.
- 36) Martínez G. Sigatoka negra en Venezuela, informe 1997. Infomusa 1998. Vol 7, No 1, Pág. 31-32.
- 37) Mulder J. and Stover R. *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. Transactions of the British Mycological Society 1976. Chapter 67, 77-82.
- 38) Pons N. Notes on *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Transactions of the British Mycological Society 1987. Chapter 89, 120-124.
- 39) Leach R. Banana Leaf Spot (*Mycosphaerella musicola*) on the Gros Michel Variety in Jamaica. Investigations on the Aetiology of





- the Disease and the Principles of Control by Spraying. Kingston, Jamaica: Government Printer. 1946.
- 40) Stover R. Sexuality and Heterothallism in *Mycosphaerella musicola*. Can. J. Bot. 1963
  - 41) Perez L. Manual para el manejo integrado de Sigatoka negra y Sigatoka amarilla en banano y plátano. Proyecta TCP/CUB/4454. 27pp 1996.
  - 42) Meredith D., Lawrence J., Firman I. "Ascospore release and dispersal in black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*)". Transaction of the British Mycological Society 1973. Chapter 60, 547 – 54
  - 43) Pérez L. Control de Sigatoka negra en Cuba: Un enfoque de manejo integrado de la enfermedad. Infomusa 1998. Vol 7, No 1, Pág. 26-30.
  - 44) Stover R. "Estimation of losses by Sigatoka disease of bananas. En: Crop loss assessment methods. FAO Manual on the evaluation and prevention of losses by pests, disease and weeds. Ed. L. Chiarappa FAO and CAB. Edinburg. 1980.
  - 45) Fouré E. Contribution to genetic control of banana and plantain Sigatoka leaf spot in Cameroon: studies on varietal susceptibility and early inoculation trials on plantlets produced by in vitro culture. In: Fullerton, R.A. and Sover, R.H. (eds) Sigatoka Leaf



Spot Disease of Bananas, Proceedings of international Workshop held in San José, Costa Rica, March 28-April 1, 1989. INIBAP, Montpellier, France, 1990. pp. 290-305.

- 46) Johanson A. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. 1993.V97 (6) Pag. 670 – 674.
- 47) Fullerton R. and Olsen T. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 1995. Chapter 23, 39-48.
- 48) Fouré E. Les Cercosporioses du bananiers et leurs traitements. Comportement des variétés. Étude de la sensibilité variétal des bananiers et plantains à *Mucosphaerella fijiensis* MORELET au Gabon (maladie des raies noires) (suitelll). Fruits (1985)40: 393 - 399.
- 49) Fouré E. Varietal reactions of bananas and plantains to black leaf streak disease. In: Persley, G.J and De Langhe, E.A. (ed.) Banana and Plantain Breeding Strategies, Proceeding No. 21, ACIAR, Canberra, Australia, 1987 pp. 110-113.
- 50) Becerra E. Manejo de Formulaciones de Dithane para el control de Sigatoca negra en Banano, Dow AgroScience, publicado en Banana export, año 6, Edición No. 21 Julio/05 pag. 22 – 23.





- 51) Romero R. and Sutton T. Reaction of four *Musa* genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different regions. *Plant Disease*, (1997). 81: 1139 – 1142.
- Jácome. L. H. and Schuh W. "Effect of leaf wetness duration and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopatology*, (1992). 82: 515 - 520
- 52) Fritig B., Heitz T., Legrand M.,. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.*, (1998) 10, 16–22.
- 53) Carlier J., Gonzales de León D., Mourichon X. and Zapatier M.F. "DNA restriction length polymorphism in *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot disease. *Proceedings VII. International Congress of Plant Pathology*, Montreal. Jul 28 – Ago 5. 1993.
- 54) Litt M., Luty J. "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene". *Am J. Hum Genet.* (1989) 44: 397-401.
- 55) Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H. "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction". *Cold SpringHarb. Symp. Quant. Biol.* (1986.) 51, 263-273.
- 56) Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Eafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR



- (Microsatellites) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* (1996). 2: 225-238.
- 57) Gauhl F. Epidemiología y Ecología de la Sigatoca negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET) en plátano (*MUSA sp.*), en Costa Rica. Editado por INIBAP. (1994) 120 pp.
- 58) FAOCLIM World-wide agroclimatic data base GMS Publish Version 1.2 Da Vinci Consulting s.a. (1993)
- 59) Carlier J. Tesis: "Estudio de la estructura de las poblaciones, por RFLP, de *Mycosphaerella fijiensis*, agente responsable de la enfermedad de la raya negra del Banano" Universidad de PARIS-SUD Centre D'ORSAY, Julio 1994.
- 60) Neu C., Kaemmer D., Kahll G., Fischer D. & Weising K. "Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*". Blackwell Science Ltd, *Molecular Ecology*, 8, (1999) 513 – 525
- 61) Perea I., Rodriguez A., Marquez E., Arango R. Genetic diversity of Colombia isolates of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet based on microsatellite markers. *Infomusa* – Vol. 14 No. 2 (2005) 18 –21.
- 62) Conde L., Waalwijk C., Canto B., Kema G., Crous Pedro, James A. and Abelin E. Isolates and characterization of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf





- streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology* (2007) 8(1), 111 – 120.
- 63) Nei M., Maruyama T., Chakraborty R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, (1975) 29, 1 – 10.
- 64) Maruyama T., Fuerst P.. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by recent bottleneck. *Genetics*, (1985) 111, 675 – 689.
- 65) Cornuet J., Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, (1996). 144, 2001 – 2014.
- 66) Shaw M., Royale D. Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. *Plant Pathology* (1989) 38: 35 – 43.
- 67) Birky C. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes-mechanisms and evolution. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* (1995). 92: 11331 – 11338
- 68) Russell P. *Genetics*. Harper Collins College Publishers, New York. 1996.
- 69) Kninght S., Wirz M., Amil A., Cook A. Fungicide resistance in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet: Current status and outlook. ACORBAT proceedings. 2002.

- 70) Marín D., Romero R., Guzman M., Sutton T. Black Sigatoca: An increasing threat to banana cultivation. *Plant disease* (2003) 87: 208 – 222.
- 71) Coenen A., Croft J., Slakhorst M., Debets F., Hoekstra R. Mitochondrial inheritance in *Aspergillus nidulans*. *Genetic Research* (1996). 67: 93 – 100.
- 72) Robinson H., Ridout C., Sierotzki H., Gisi U., Brown J. Isogamous, hermaphroditic inheritance of mitochondrion-encoded resistance to Qo inhibitor fungicides in *Blumeria graminis f. sp. Tritici*. *Fungal Genetics and Biology* (2002). 36: 98 - 106
- 73) Janzen DH. When is it coevolution? *Evolution* (1980) 34: 611 – 612
- 74) Van der Biezen E., Jones D. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in – Biochemical Science* (1998) 23: 454 – 456.
- 75) Goodwin S., van der Lee T., Cavaletto J., Hekkert B., Crane C. and Kema G. Identification and genetic mapping of highly polymorphic microsatellites loci from an EST database of the septoria tritici blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*. (2007) Vol 44, (5) 398 – 414.



# ÍNDICE GENERAL

|   | Pág. |
|---|------|
| RESUMEN.....  | I    |
| INDICE DE FIGURAS.....  | II   |
| INDICE DE TABLAS.....   | III  |
| ABREVIATURAS.....   | IV   |
| INTRODUCCIÓN.....   | V    |
| CAPITULO 1  |      |
| 1. MECANISMOS DE LA SELECCIÓN NATURAL.....                    | 4    |
| 1.1 La dinámica genética de las poblaciones en evolución..... | 5    |
| 1.1.1 Ecología de las poblaciones.....                        | 5    |
| 1.1.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....                       | 6    |
| 1.1.3 Procesos de Mutación.....                               | 8    |
| 1.1.3.1 Orígenes de la resistencia.....                       | 9    |
| 1.1.4 Flujo genético.....                                     | 11   |
| 1.1.5 La deriva genética.....                                 | 14   |
| 1.1.5.1 Efecto fundador.....                                  | 16   |
| 1.2 Selección sexual.....                                     | 18   |
| 1.2.1 Heterocigosidad.....                                    | 21   |

## CAPITULO 2



|  |    |
|--|----|
| 2. DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL.....     | 23 |
| 2.1 Estructura de las poblaciones..... | 23 |

CAPITULO 3

|   |    |
|---|----|
| 3. DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....                                  | 25 |
| 3.1 Origen y Distribución de la Sigatoka Negra.....                   | 25 |
| 3.2 Biología de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....                 | 28 |
| 3.2.1 Taxonomía y Morfología.....                                     | 30 |
| 3.2.2 Mecanismos de dispersión de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ... | 32 |
| 3.2.3 Ciclo de Vida.....  | 33 |
| 3.2.3.1 Reproducción de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....         | 33 |
| 3.2.3.2 Epidemiología de la enfermedad.....                           | 36 |
| 3.2.3.3 Control de la enfermedad.....                                 | 39 |
| 3.2.3.3.1 Control químico.....  | 39 |
| 3.2.3.3.2 Prácticas y Control orgánico.....                           | 40 |
| 3.2.4 Variabilidad patogénica.....                                    | 42 |
| 3.2.5 Diversidad genética de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....    | 44 |

CAPITULO 4

|                        |    |
|------------------------|----|
| 4. MICROSATÉLITES..... | 46 |
|------------------------|----|

CAPITULO 5





