

Identificación de Genes Candidatos de Resistencia a Sigatoka negra en Variedades de Banano y Plátano

Saavedra C. y Santos E.*

Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE)

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Campus Gustavo Galindo, Km 30.5 vía Perimetral,

Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador.

Autor: csaavedr@espol.edu.ec

*Autor de correspondencia: efren.santos@gmail.com, gsantos@espol.edu.ec

Resumen

El control químico y la selección de plantas resistentes continúan siendo las estrategias mayormente usadas para combatir la Sigatoka negra en la producción de banano. La ingeniería genética tiene el potencial para la generación de plantas con cierta resistencia/tolerancia al hongo, por lo que la aplicación de fungicidas sería reducida. Este estudio tiene como objetivo identificar genes candidatos de resistencia a la infección del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causante de la Sigatoka negra en variedades de banano y plátano procedentes de la Colección Mundial de Musa (Transit Center INIBAP, Leuven, Bélgica) y del germoplasma del CIBE mediante el uso de iniciadores que amplifican genes de resistencia identificados en otras especies. Se utilizaron 28 plantas in vitro de la especie *Musa* spp. de los cuales se extrajo ADN total a partir de tejido foliar. Se realizó la PCR con iniciadores de genes de quitinasa y análogos de resistencia. Posteriormente se secuenciaron ampliaciones de seis plantas representativas y se analizaron sus secuencias con herramientas bioinformáticas. Asimismo, se realizó un RT-PCR para determinar la expresión del gen de quitinasa en plantas de la variedad de 'Calcutta-4' inoculada con *M. fijiensis*, que posee una resistencia natural a la enfermedad. Se observó la presencia de genes de quitinasa y análogos de resistencias en algunas variedades. Hubo ciertas diferencias en las secuencias de quitinasa y genes análogos de resistencia de seis variedades representativas. El gen de quitinasa se expresa de manera basal en la variedad resistente 'Calcutta-4' y así mismo cuando existe inoculación con *M. fijiensis* a las seis, nueve y doce días después de inoculado el patógeno. Posteriores estudios se deben realizar para verificar si la sobreexpresión de estos genes en variedades de banano susceptibles a la Sigatoka negra confiere resistencia a la enfermedad.

Palabras Claves: *Musa* spp., PCR, RT-PCR, Genes candidatos de resistencia, *Mycosphaerella fijiensis*

Abstract

Chemical control and selection of resistant plants remain largely the strategies used to control Black Sigatoka in banana production areas. Genetic engineering has the potential to generate plants with resistance/tolerance to the fungus, leading to a reduced chemical application. This study aims to identify candidate genes for resistance to infection of the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causes Black Sigatoka banana and plantain varieties from a collection of the INIBAP Transit Center (Leuven, Belgium) and a local germplasm collected by CIBE. Total DNA extraction was performed in 28 in vitro *Musa* spp. Plantlets. Amplification of candidate resistant including chitinases and resistant gene analogous genes through PCR was done by using specific primers. Amplicons from six representatives *Musa* varieties were sequenced and analyzed with bioinformatic tools. Furthermore, gene expression of chitinase gene was performed in 'Calcutta-4' greenhouse after inoculation with *M. fijiensis*, which has a natural resistance to Black Sigatoka. Presence of chitinase and resistant gene analogous were detected in some *Musa* varieties, revealing differences in nucleotides sequences in the six representative varieties. Basal chitinase gene expression was detected in 'Calcutta-4' in mock inoculation and after application of *M. fijiensis*. Further studies need to be performed to verify that overexpression of candidate resistant genes in susceptible banana cultivars to Black Sigatoka confers resistant to the disease.

Keywords: *Musa* spp, PCR, RT-PCR, candidate resistance genes, *Mycosphaerella fijiensis*.

1. Introducción

En Ecuador, 216.115 ha. de banano y 110.693 ha. de plátano fueron cosechadas en el 2009. El control de la Sigatoka negra anualmente ocasiona un gasto de \$140.000.000 en las 216.115 ha de banano cultivadas [1]. Por lo tanto, la Sigatoka negra producida por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet es el principal problema fitosanitario que amenaza la producción de estas fuentes de alimentos y divisas, y es una enfermedad altamente destructiva que puede ocasionar pérdidas en el rendimiento entre un 50% y 100%, afectando de manera notoria la economía del productor [2].

En Ecuador, para controlar el ataque de la Sigatoka negra, se ha venido efectuando fumigaciones aéreas y terrestres con una amplia gama de fungicidas y como consecuencia los impactos sobre el medio ambiente y la salud de los trabajadores no son fáciles de corregir [2]. El control químico continúa siendo la estrategia mayormente usada para combatir la Sigatoka negra. La ingeniería genética tiene el potencial para la generación de plantas con cierta resistencia o tolerancia al hongo, reduciendo el uso de fungicidas.

La incorporación de genes de resistencia es uno de los mayores desafíos para los mejoradores durante el desarrollo de nuevos cultivares. La ofrece nuevas herramientas a los mejoradores, aumentando las posibilidades y la eficiencia en la obtención de variabilidad genética y en la selección de caracteres deseables, brindando además alternativas viables para identificar, seleccionar y transferir genes de resistencia [3]. A través de la ingeniería genética es posible insertar solo los genes necesarios para proporcionar ciertas características deseadas como resistencia a enfermedades, por lo que las propiedades organolépticas o características de postcosecha se mantendrían como en el cultivar original [3].

Los genes candidatos a resistencia a Sigatoka negra identificados en banano se pueden utilizar para introducirlos junto con promotores y terminadores de banano para producir bananos transformados genéticamente con secuencias de ADN de la misma especie, por lo que pudieran considerarse como bananos cisgénicos (la introducción de genes en una planta, con sus promotores originales, de una planta compatible de cruzamiento o de la misma planta) y no transgénicos [3]. Por lo tanto la identificación y aislamiento de genes de resistencia, sin duda tendrá un impacto importante en esta área.

El uso de estas tecnologías en musáceas es bien justificado dado que el mejoramiento genético convencional es limitado por la alta esterilidad y niveles de ploidía de los cultivares comerciales [4]. Por consiguiente la introducción de características de

resistencia mediante transformación genética tiene potencial para ser una técnica importante en el mejoramiento del banano [5].

2. Materiales y Métodos.

2.1 Material Vegetal

Para este estudio se utilizaron 21 variedades de *Musa* spp., correspondientes a cinco variedades susceptibles, 12 tolerantes y cuatro resistentes a la Sigatoka negra según la Colección Mundial de *Musa* (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica). Además, se analizaron siete cultivares Ecuatorianos de banano y plátano procedentes de la colección de germoplasma del CIBE.

2.2 Extracción de ADN

El ADN total se extrajo de un gramo de tejido de hoja de plantas in vitro de cada variedad siguiendo los protocolos de extracción de ADN descritos por DellaPorta [6] y Aljanabi [7] y modificado por Santos [8].

2.3 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR con iniciadores de actina (control) fueron realizadas en tubos de 0.2 mL con el equipo de PCR Mastercycler Gradient (Eppendorf). La mezcla por reacción de PCR consistía de 1X Tampón *Taq* (Invitrogen), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.5 μM cada iniciador (actina1F3: CCCAAGGCAAACCGAGAGAAG; actinaR2: GTGGCTCACACCATCACCAG), 0.5 U μL⁻¹ *Taq* polimerasa (Invitrogen), 20 – 100 ng ADN molde en un volumen total de 20 μL. El programa de la PCR consistió de una desnaturalización inicial a 95.0 °C por dos minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 95.0°C por 30 s, anillamiento de iniciadores a 60°C por 30 s y elongación a 68°C por 30 s, culminado con una elongación final de 68°C por dos minutos.

2.4 Determinación de presencia de genes candidatos de resistencia.

Las mezclas de PCR contenían Gotaq 1X (Promega), 0.5 μM de cada iniciador y 2.5 – 10 ng μL⁻¹ ADN en un volumen total de 25 μL. Para la amplificación de los genes de quitinasa se utilizaron dos pares de iniciadores (CIBE1: ATCAATCCCACGTGCAGTCT; CIBE2: ATTTCTTCCAGGAGCACAA; y CIBE3: ACGTACAACGCCTTCATCG, CIBE4: GCGTTATTACATGGATTTCGTCA). El programa de la PCR consistió de una desnaturalización inicial a 94.0 °C por dos minutos, luego 35 ciclos de

desnaturalización a 94.0 °C por 30 s, anillamiento de iniciadores a 60.0 °C por 30 s y elongación a 72.0 °C por dos minutos, culminado con una elongación final de 72.0 °C por cinco minutos.

Las mezclas de PCR contenían en concentración final Go taq 1X (Promega), 0.5 μ M de cada iniciador y, 2.5 – 10 ng μ L⁻¹ ADN en un volumen total de 20 μ L. Para los genes análogos de resistencia se utilizaron dos pares de iniciadores de acuerdo a Miller et al [9]: (CIBE5: GAGGTACTTCCTGGTGCTGGAYGAYRTBTGG, CIBE6: CGGCCAAGTCGTGCAYVAKRTCRTGCA; y CIBE7: GGIATGGGIGGIIIIGGIAARACIAC; CIBE8: AIITYIRIIRYYAAIGGIAGICC). El programa de la PCR consistió de una desnaturalización inicial a 96.0 °C por cinco minutos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 96.0 °C por un minuto, anillamiento de iniciadores a 45.0 °C por un minuto y elongación a 72.0 °C por un minuto, culminado con una elongación final de 72.0 °C por 10 min.

2.2.4 Clonación y secuenciación de amplicones.

Para la clonación de los amplicones, se realizó la PCR con una extensión final de 72°C por 10 minutos. El producto de PCR crudo fue utilizado para la clonación en el vector pCR4-TOPO del kit TOPO TA cloning (Invitrogen) de acuerdo a las instrucción del manual. La confirmación de la clonación se efectuó mediante PCR utilizando los iniciadores M13F (GTAAAACGACGGCCAG) y M13R (CAGGAAACAGCTATGAC) en colonias de *E. coli* resistentes a kanamicina. A las colonias que presentaban el amplicón de acuerdo al tamaño esperado, se realizó un cultivo líquido para extracción del plásmido de acuerdo al kit Purelink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). Los plásmidos se enviaron a secuenciación comercialmente en MacroGen (Maryland, Estados Unidos).

2.2.5 Análisis bioinformático de amplicones.

Las secuencias de quitinasa y de genes análogos de resistencia fueron obtenidas de dos accesiones resistentes a la Sigatoka negra ('Calcutta-4' y 'Tuu Gia'), dos cultivares de banano ('Williams' y 'Orito') y dos cultivares de plátanos ('Barraganete' y 'Dominico'). Una vez obtenidas las secuencias de los amplicones se utilizó el programas blastn para determinar similitud con las secuencias del GenBank, Asimismo, se utilizó el programa ClustalW para la alineación múltiple de las secuencias y Clustal Phylogenetic para obtener el dendograma.

2.2.6 Determinación de expresión génica de genes candidatos.

Se realizó una inoculación de *M. fijiensis* en la variedad de banano 'Calcutta-4' en condiciones controladas [10]. Se realizaron las inoculaciones a las hojas de las plantas con conidias de *M. fijiensis* a una concentración de 20.000 conidias/mL y se recolectó la hoja 3 a los 6, 9 y 12 días después de inoculado. Asimismo, se recolectó la misma hoja de plantas que se les aplicó con la solución sin conidias.

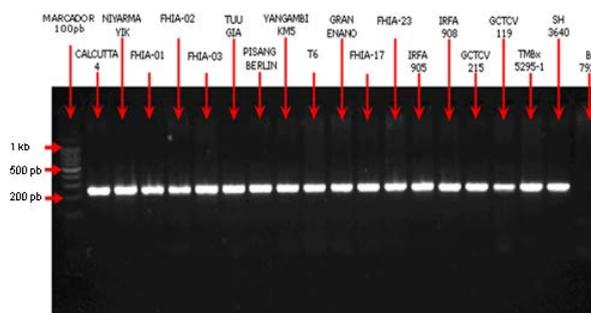
Para la extracción de ARN se utilizó aproximadamente 100 mg de muestras. La extracción se llevo a cabo utilizando el kit Spectrum™ Plant Total RNA (SIGMA). EL ARN total fue tratado con DNAsa (RQ1 RNase- Free, Promega) de acuerdo a lo recomendado.

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 μ g de ARN utilizando el kit Go Taq® 2-Step RT- PCR System (Promega). La reacción de PCR se la realizó usando los iniciadores qrtpr-chitinase-F1 (GACGACGCCAAGAAGAAGAG) y qrtpr-chitinase-R1 (TAGTCCGATGAGGGGTTCTG) diseñados a partir de la accesión de *Musa* AJ277278.1 del Gen Bank. Las condiciones del PCR fueron desnaturalización inicial 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 30 s., 60°C por 30 s., y 72°C por 45 s.; con una extensión final de 68°C por 2 min.

3. Resultados y discusión

3.1 Presencia de genes de quitinasa y análogos de resistencia en variedades de banano y plátano

Con el ADN extraído de todas las variedades de banano y plátano se preparó una mezcla de PCR con iniciadores de Actina 1F3 y R2 para determinar si el ADN puede ser usado para PCR y si los iniciadores de actina se anillan en el gen de las diferentes variedades de *Musa* (Fig. 1). En la mayoría de las variedades en estudio los iniciadores de actina amplificaron un producto.



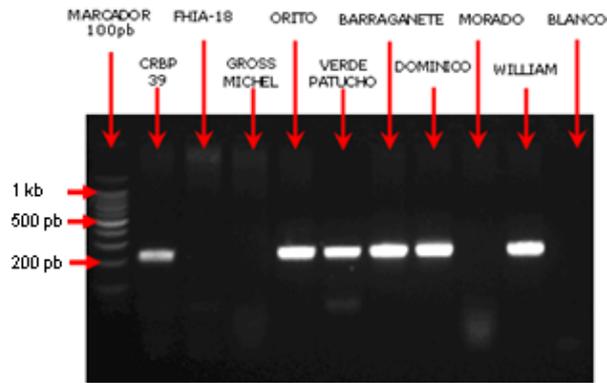


FIGURA 1. Amplificación con iniciadores de Actina 1F3 y R2. Gel de Agarosa al 1%. Marcador 100pb DNA ladder (PROMEGA).

No hubo presencia de amplicones cuando se utilizaron los iniciadores CIBE 1 y CIBE 2 en el ADN de todas las variedades de banano y plátano pero si hubo presencia de amplicones de quitinasa amplificado con los iniciadores CIBE 3 y CIBE 4 en el ADN de algunas variedades de banano y plátano (Fig. 2). Asimismo, hubo presencia de genes análogos de resistencia con los iniciadores CIBE 5 y CIBE 6 en el ADN de algunas variedades de banano y plátano (Fig. 3) mientras que no hubo presencia de amplicones con los iniciadores CIBE 7 y CIBE 8 en el ADN de todas las variedades de banano y plátano.

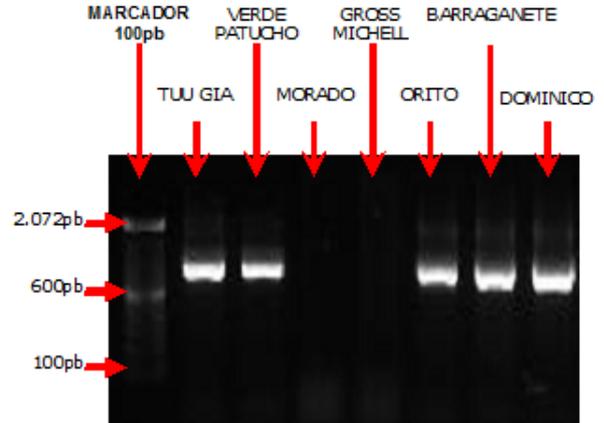


FIGURA 2. Presencia de genes de quitinasa usando los iniciadores CIBE 3 y CIBE 4 en *Musa spp.* Gel de Agarosa al 1%. Marcador 100pb DNA ladder (Invitrogen).

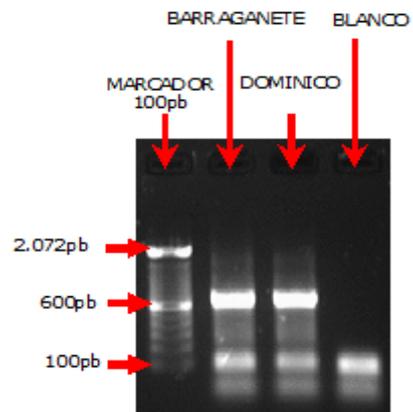
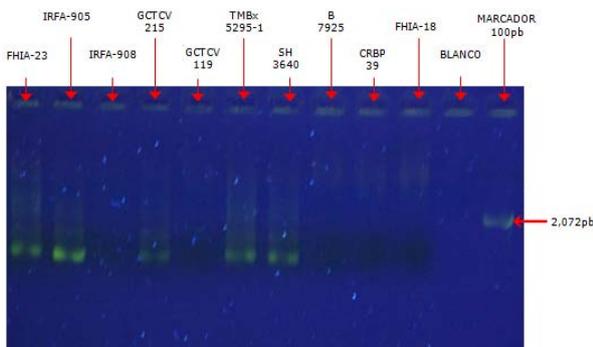
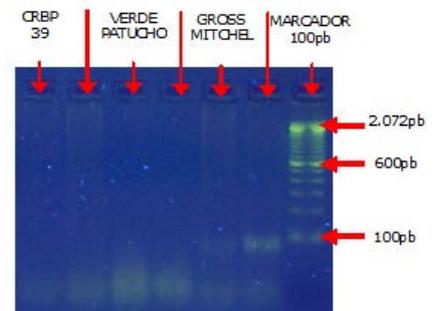
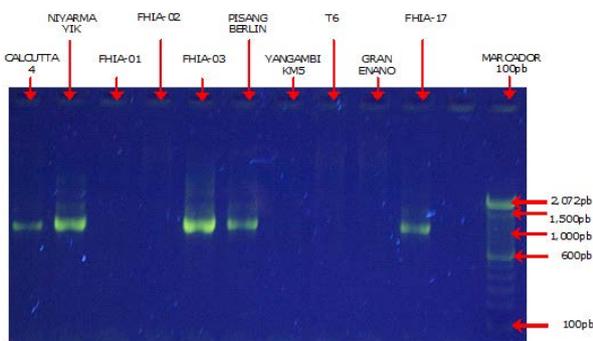
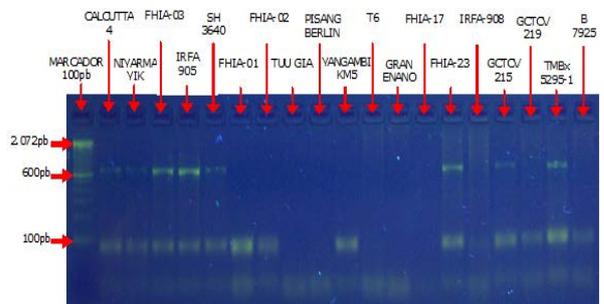


FIGURA 3. Presencia de genes análogos de resistencia CIBE 5 y CIBE 6 en *Musa spp.* Gel de Agarosa al 1%. Marcador 100pb DNA ladder (Invitrogen).

La presencia de banda de genes de quitinasa y análogos de resistencia en las variedades de banano y plátano se detalla (Tabla 1).

Tabla 1. Presencia de bandas con genes de quitinasa o análogos de resistencia.

Resistencia	Nombre de Accesoión	Presencia de banda			
		GENES DE QUITINASA		GENES ANALOGOS	
		Cibe 1-2	Cibe 3-4	Cibe 5-6	Cibe 7-8
Resistente	Calcutta 4	No	Si	Si	No
	Tuu Gia	No	Si	No	No
	Yangambi Km5	No	Si	No	No
	T6	No	Si	No	No
Tolerante	Fhia-1	No	Si	No	No
	Fhia-2	No	No	No	No
	Fhia-3	No	Si	Si	No
	Fhia-17	No	Si	No	No
	Fhia-23	No	Si	Si	No
	Irfia-905	No	Si	Si	No
	Irfia-908	No	Si	No	No
	TMBx 5295-1	No	Si	Si	No
	SH-3640	No	Si	Si	No
	B-7925	No	No	No	No
	CRBP-39	No	No	No	No
	Fhia-18	No	No	No	No
	Susceptible	Niyarma Yik	No	Si	Si
Pisang Berlin		No	Si	No	No
Gran Enano		No	No	No	No
Gctcv-215		No	Si	Si	No
Gctcv-219		No	No	No	No
Verde Patacho		No	Si	No	No
Morado		No	No	No	No
Gross Michell		No	No	No	No
Orito		No	Si	No	No
Barraganete		No	Si	Si	No
Dominico		No	Si	Si	No
William		No	Si	Si	No

Para determinar si existe algún polimorfismo de los amplicones obtenidos de diferentes variedades de *Musa* spp. se realizó una digestión del producto de PCR con las enzimas *Hha*I y *Mbo*I. No hubo diferencias en el patrón las bandas generadas por la digestión de los amplicones de los genes candidatos de resistencia en variedades resistentes y susceptibles a la enfermedad (Figs. 4 y 5).

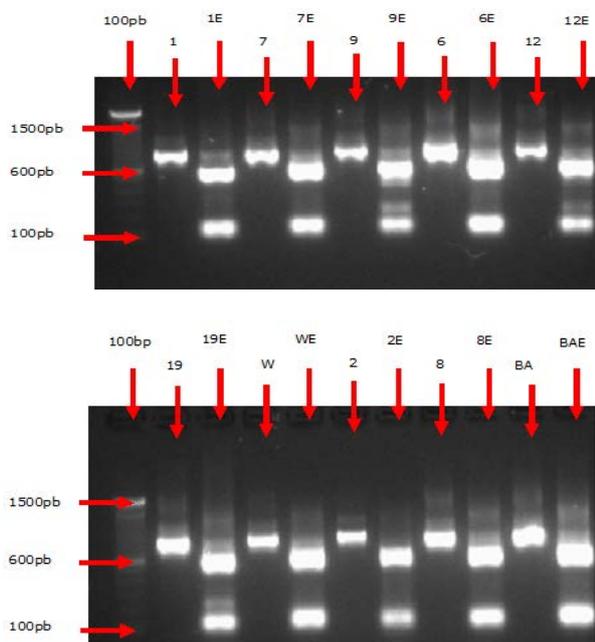


FIGURA 4. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes, tolerables y susceptibles a la Sigatoka negra. 1, 'Calcutta-4'; 7, 'Tuu Gia'; 9, 'Yangambi Km5'; 6, 'FHIA 3'; 12, 'FHIA 17'; 19, 'SH-3640'; W, 'Williams'; 2, 'Niyarma Yik'; 8, 'Pisang Berlin'; BA, 'Barraganete'. Los números enteros indican ADN total sin digerir; los números seguidos de la letra E indican que se realizó digestión con la enzima *Hha* I.

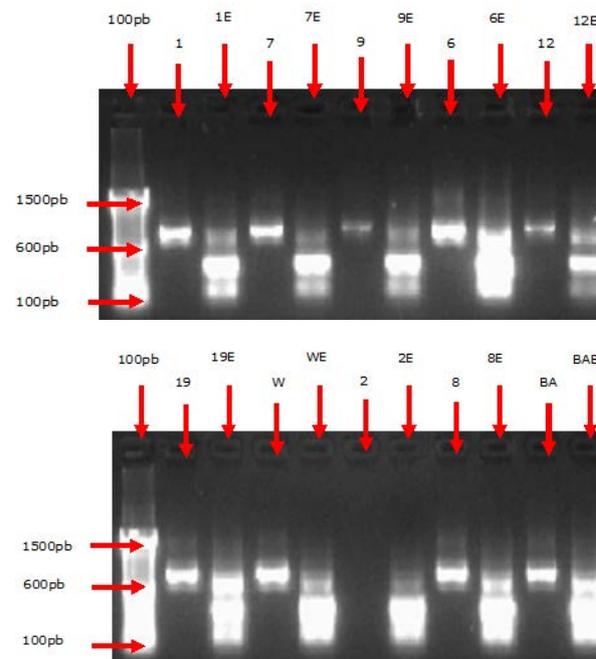


FIGURA 5. Corte de enzima de restricción de genes candidatos de resistencia en variedades resistentes, tolerables y susceptibles a la enfermedad. . 1, 'Calcutta-4'; 7, 'Tuu Gia'; 9, 'Yangambi Km5'; 6, 'FHIA 3'; 12, 'FHIA 17'; 19, 'SH-3640'; W, 'Williams'; 2, 'Niyarma Yik'; 8, 'Pisang Berlin'; BA, 'Barraganete'. Los números enteros indican ADN total sin digerir; los números seguidos de la letra E indican que se realizó digestión con la enzima *Mbo* I.

3.3 Expresión de quitinasa en una variedad resistente a la Sigatoka negra.

En la variedad 'Calcutta-4' (resistente a Sigatoka negra) se determinó si el gen de la quitinasa se expresa, durante la infección con *M. fijiensis* en condiciones controladas. El gen de quitinasa se expresa normalmente cuando está inoculado con *M. fijiensis*, pero también cuando no está inoculado con el patógeno excepto para el día 12 después de la aplicación (Fig. 6). La función del gen de quitinasa en la respuesta a resistencia al Sigatoka negra es posible pero se necesitan realizar más estudios, ya que al menos se expresa durante la infección pero también de forma basal.

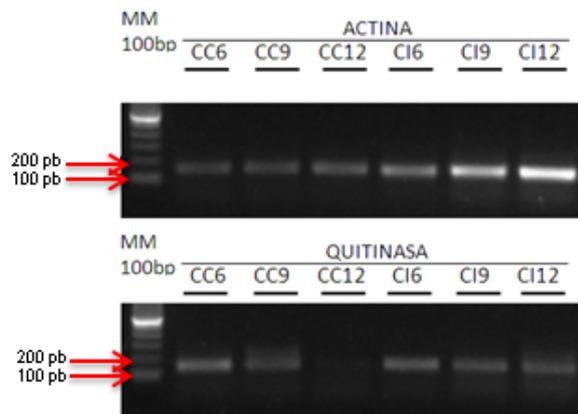


FIGURA 6. Expresión de genes de actina y quitinasa 'Calcutta-4'. RT-PCR para determinar expresión del gen quitinasa en 'Calcutta-4' a los seis (C16), nueve (C19) y doce (C12) días de haber sido inoculado con *M. fijiensis* en condiciones controladas. CC6, CC9 y CC12 se refiere a días después de haber sido aplicado la solución sin conidias de *M. fijiensis*.

3.4 Análisis de secuencias de quitinasa y genes análogos de resistencia.

Se secuenciaron los amplicones de quitinasa y de genes análogos de resistencia de seis variedades de *Musa* representativas de acuerdo al nivel de resistencia a la Sigatoka negra. Se observa que las variedades resistentes se agrupan mientras que los cultivares ecuatorianos forman dos grupos (Fig. 7). Por otro lado, los genes análogos de resistencia no mostraron agrupaciones solamente de resistentes a la enfermedad (Fig. 8). Los genes de quitinasa y análogos de resistencia son candidatos a ser utilizados en un programa de mejoramiento genética en algunas especies vegetales con resistencia a algunos patógenos incluyendo hongos. Sin embargo, es necesario realizar la sobreexpresión de estos genes candidatos en variedades de banano susceptible para determinar si las plantas se vuelven resistentes a la Sigatoka negra.



FIGURA 7. Agrupación de variedades de banano y plátano según la diferencia que existen en la secuencia del ADN con genes de quitinasa usando el programa Clustal Phylogenetic.

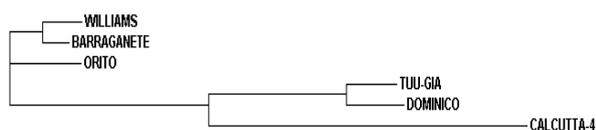


FIGURA 8. Agrupación de variedades de banano y plátano según la diferencia que existen en la secuencia del ADN con genes análogos de resistencia usando el programa Clustal Phylogenetic.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Los genes de quitinasa y análogos de resistencia están presentes en algunas variedades de banano y plátano, que pueden ser resistentes, tolerables o susceptibles a la sigatoka negra en banano.

El gen de quitinasa se expresa en la variedad 'Calcutta-4' de forma basal y cuando se inocula con *M. fijiensis*.

4.2 Recomendaciones

Confirmar la expresión de los genes encontrados en variedades con distinto grado de resistencia a la Sigatoka negra en bioensayos con inoculaciones controladas de *M. fijiensis*.

Realizar pruebas de transformación genética para sobreexpresar los genes de quitinasa y análogos de resistencia para determinar si confieren resistencia a la sigatoka negra en variedades susceptibles a la enfermedad.

5. Agradecimientos

Al personal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por la realización de este trabajo, especialmente a la Doctora Esther Peralta, al Ingeniero Eduardo Sánchez, al Biólogo Christian Romero y a la Ingeniera Lisette Hidalgo.

6. Referencias

- [1] FAOSTAT (2009) Food and Agricultural Organization of the United Nations Statistical Databases, , ProdSTAT, Crops - Bananas, plantains - World Production <<http://faostat.fao.org/>> Consultado el 18 de marzo del 2011.
- [2] Jose Leonel Vargas Reyes. 2010. Antecedentes del banano. <http://www.monografias.com/trabajos73/antecedentes-banano-platano/antecedentes-banano-platano.shtml> (Último acceso, Diciembre de 2010).
- [3] Phil Rowe. 1998. Mejoramiento de banano y plátano resistentes a plagas y enfermedades. Pág. 56-62.
- [4] Vuylsteke, D; Hartman, J; Tenkouano, A. 1999. Breeders' perspective on biotechnology for *Musa* improvement. INFOMUSA 8(1):6-7.

- [5] Sági L (1999) Genetic engineering of Banana for disease resistance – Future Possibilities. In: Diseases of Banana, Abacá and Enset. D.R. Jones, editor. CAB International, Wallingford, UK. pp. 465-515.
- [6] DELLAPORTA SL, WOOD J, HICKS JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant Molecular Biology Reports 1: 19-21
- [7] Aljanabi, S. Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt – extraction of high quality genomic DNA for PCR – based techniques. Nucleic Acids Research 25. Pp. 4692 – 4693.
- [8] Dangl, J. L., Jones, J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature 411: 826-833.
- [9] Robert NG Miller , David J Bertioli, Franc C Baurens, Candice MR Santos, Paulo C Alves, Natalia F Martins , Roberto C Togawa, Manoel T Souza Júnior and Georgios J Pappas Júnior. Analysis of non-TIR NBS LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. 2008 Miller et al. Pág. 3.
- [10] Jiménez M, Van der Veken I, Neiryneck H, Rodriguez H, Ruiz O, Swennen R (2007) Organic banana production in Ecuador: its implications on black Sigatoka development and plant-soil nutritional status. Renew Agric Food Syst 22: 297-306