

Análisis del Polimorfismo de 21 Genotipos de *Musa spp.*, Mediante el Uso de Marcadores Microsatélites.

C. A. Romero ^(1,2), P. A. Chong ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral. Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador.

caromero@espol.edu.ec ^(1,2); pachong@espol.edu.ec ⁽¹⁾

⁽²⁾ Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral. Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador.

Resumen

*Este estudio fue llevado a cabo en 21 accesiones de diferentes genotipos de *Musa spp.*, procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) con el objetivo de determinar la relación entre diversidad genética y el nivel de resistencia a la infección del hongo *Mycosphaerella fijiensis* causante de la Sigatoka Negra. Se usaron un total de 20 marcadores microsatélites, 10 derivados del genoma de *M. acuminata* y 10 derivados del genoma de *M. balbisiana*. Diecinueve marcadores produjeron bandas definidas y generaron un total de 85 alelos, con un promedio de 5.1 alelos por iniciador. El promedio de diversidad genética fue de $He = 0,719$ y el índice de fijación $F_{ST} = 0,409$. Estos resultados demuestran que existe una muy alta diferenciación genética entre los 21 genotipos de *Musa spp.* El análisis del Dendograma mostró que los genotipos susceptibles son genéticamente más cercanos a los genotipos tolerantes y los genotipos hiper resistentes están genéticamente más alejados de los genotipos tolerantes y susceptibles.*

Palabras clave: *Musa spp*, polimorfismo, marcadores microsatélites, diversidad genética, índice de fijación.

Abstract

*This study was conducted in 21 accessions of different genotypes of *Musa spp.*, from the Worldwide Collection (INIBAP Transit Center, Catholic University of Leuven, Belgium) with the objective to determine the relationship between genetic diversity and the level of resistance to the fungus *Mycosphaerella fijiensis* causing black Sigatoka infection. We used a total of 20 microsatellite markers, 10 derived from the genome of *M. acuminata* and 10 derived from the genome of *M. balbisiana*. Nineteen markers produced well defined bands and generated a total of 85 alleles, with an average of 5.1 alleles per primer. The average genetic diversity was 0,719 and fixation index $F_{ST} = 0,409$. These results show a very high genetic differentiation among the 21 genotypes of *Musa spp.* The hierarchical cluster analysis showed that susceptible genotypes are genetically closer to tolerant genotypes and hyper resistant genotypes are genetically more distant that tolerant and susceptible genotypes.*

Key words: *Musa spp*, polymorphism, microsatellite markers, genetic diversity, fixation index.

1. Introducción

En el Ecuador existen aproximadamente 170.000 hectáreas (ha) de banano, ubicadas en la región Litoral o Costa, particularmente en las provincias de Los Ríos (50 419 ha), Guayas (44.646 ha) y El Oro (43.353 ha) [1]. Este sistema de producción es afectado por muchas plagas y enfermedades, entre ellas la más importante la Sigatoka Negra, cuyo agente causal es un hongo Ascomiceto denominado *Mycosphaerella fijiensis* [2].

El impacto que este hongo ha causado, no solamente tiene importancia desde el punto de vista económico, sino también ambiental debido a la alta concentración de pesticidas que se utilizan en las plantaciones para su erradicación. Los costos del control de la enfermedad pueden llegar a los USD 1000/ha, en las grandes plantaciones. Para los pequeños productores, el costo es mayor porque la aplicación aérea no es posible [2, 3].

El control de la Sigatoka Negra es uno de los grandes problemas que enfrenta el País. Al momento existen alrededor de 27 mil hectáreas afectadas [4]. Por tal motivo es de vital importancia que trabajos de investigación estén encaminados a buscar nuevas estrategias de control [3]. 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. Sin embargo, ha sido difícil encontrar variedades resistentes y que sean de interés comercial [5].

El desarrollo de técnicas de marcadores moleculares constituye una herramienta de selección rápida, confiable y reproducible que acelera la selección de genotipos resistentes o tolerantes a una determinada enfermedad, consecuentemente permite el mejoramiento genético de los cultivos [6, 7, 8].

En el presente estudio se va a utilizar la técnica de identificación de microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs) para determinar el nivel de polimorfismo de las muestras, debido a que estos marcadores moleculares son altamente polimórficos, multi – alélicos, codominantes y fáciles de amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [9].

La tecnología de marcadores moleculares ya ha sido utilizada para caracterizar diversidad de hongos que atacan a cultivos de *Musa* [10]. Además análisis a través del uso de microsatélites han detectado un alto nivel de polimorfismo entre poblaciones de *Musa* [11].

El desarrollo y la aplicación de técnicas basadas en marcadores moleculares proporcionan la única herramienta que es capaz de revelar el nivel de

polimorfismo en una secuencia de ADN, además son adecuados para detectar la variabilidad genética entre individuos y dentro de poblaciones [6].

2. Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSRs)

Los microsatélites o SSRs, son secuencias de ADN, cuya unidad de repetición varía de de 1 a 7 pares de bases (pb), se distribuyen de forma dispersa a lo largo de todos los cromosomas de los organismos eucariotes y procariotes [12]. Estas secuencias muestran altos niveles de variación genética según las diferencias que se produzcan en las unidades repetidas en tandem de un locus [13, 14].

Estos marcadores permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Esas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, recombinación desigual, inserciones o deleciones en regiones homólogas [15, 16]. Tales diferencias pueden ser detectadas en geles de poliacrilamida, donde migran diferentes distancias de acuerdo a su tamaño [17].

3. Materiales y Métodos

3.1 Material Biológico

Un total de 21 plántulas de banano, correspondientes a 5 accesiones susceptibles, 12 accesiones tolerantes y 4 accesiones hiper resistentes, procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) fueron usadas en este estudio.

El ADN genómico de cada planta fue extraído siguiendo las especificaciones del Protocolo de Extracción de ADN descrito por DellaPorta [18] y modificado por Datta *et al.* [19] el ADN fue cuantificado mediante geles de agarosa. Los marcadores microsatélites utilizados para este estudio fueron originalmente aislados y desarrollados a partir de variedades diploides de *M. acuminata* [8] y variedades diploides de *M. balbisiana* [20]. Las muestras fueron amplificadas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) siguiendo las especificaciones descritas por Creste *et al.* [8] y Buhariwalla *et al.* [20]. Los productos de la PCR fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% y visualizados por tinción de plata.

La diversidad genética entre las accesiones fue estimada usando el programa Tools for Population Genetic Analyses (Miller, 1997). El programa Popgen 32 fue usado para determinar la frecuencia alélica por loci, el promedio de alelos por iniciador y el promedio

de heterocigosidad observada (H_O) y heterocigosidad esperada (H_E). La diferenciación genética fue estimada usando el programa FSTAT 2.9.3. 2 (Goudet, 2002).

4. Resultados y discusión

La mayoría de iniciadores produjo bandas de ADN bien definidas, excepto el iniciador MaOCEN03 que no mostró amplificación en ninguna de las 21 accesiones de banano. Un total de 85 alelos fueron generados. El número medio de alelos por iniciador fue de 5.1.

El locus MaOCEN01 fue el más polimórfico, con 8 alelos encontrados, el alelo más frecuente en este locus fue el de 242 pb, el cual presentó una frecuencia alélica del 42.9%. El alelo más frecuente en todas las poblaciones fue el alelo de 193 pb del locus Mb1-149, con una frecuencia alélica de 71,4%. El alelo de 200 pb del locus MaOCEN01, mostró la menor frecuencia alélica 2.3%. (Figura 1).

El iniciador MaOCEN05 presento el menor contenido de información polimórfica (PIC), detectó solo un 37,5 % de polimorfismo, por lo que no se recomienda su uso para este tipo de estudios.

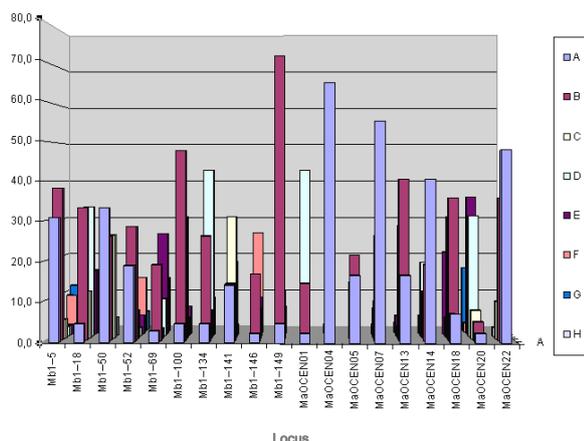


Figura 1. Frecuencia alélica de los loci analizados en los 21 genotipos de *Musa spp.*

El promedio de diversidad genética fue de $H_e = 0.7195$, el promedio de heterocigosis observada fue bastante alto $H_o = 0.7393$. Estos resultados apoyan similares observaciones realizadas por Oreiro [21] con respecto a la naturaleza altamente heterocigota del género *Musa*.

Los datos obtenidos en base al análisis con microsatélites indican que la mayoría de genotipos de *Musa* tienen un exceso de heterocigosidad. Los valores negativos de F_{IS} (Inbreeding coefficient) en todos los locus (Tabla 1) indican muy bajos niveles de endogamia dentro de la población.

Lo cual tiene concordancia con lo esperado, debido al origen diverso de los genotipos. Pappert [22], Auge [23] y Stilwell [24] han reportado que los clones de *Musa* (que son el resultado de hibridaciones intra e inter específicas) poseen altos niveles de heterocigosidad.

El valor promedio del índice de fijación (F_{ST}) fue de 0,409. Wright [25] sugiere que valores superiores a 0.25 indican una muy alta diferenciación genética dentro de la población. En base a estos valores, podemos mencionar que existe una muy alta diferenciación genética dentro de la población. (Tabla 1).

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos por Ge *et al.* [26], quien utilizando marcadores microsatélites derivados de *M. balbisiana*, determinó valores de F_{ST} ubicados en el rango de 0.29 a 0.56 con un valor promedio de 0.43.

Tabla 1. Estructura genética de la población.

| Locus | Simple Size | F_{IT} | F_{ST} | F_{IS} |
|---------------------|-------------|----------|----------|----------|
| Mb1-5 | 42 | -0,139 | 0,412 | -0,937 |
| Mb1-18 | 42 | -0,136 | 0,414 | -0,937 |
| Mb1-50 | 42 | -0,154 | 0,409 | -0,952 |
| Mb1-52 | 42 | -0,158 | 0,402 | -0,938 |
| Mb1-69 | 42 | -0,140 | 0,411 | -0,937 |
| Mb1-100 | 42 | -0,135 | 0,414 | -0,937 |
| Mb1-134 | 42 | -0,169 | 0,397 | -0,939 |
| Mb1-141 | 42 | -0,156 | 0,403 | -0,938 |
| Mb1-146 | 42 | -0,179 | 0,392 | -0,939 |
| Mb1-149 | 42 | -0,145 | 0,409 | -0,939 |
| MaOCEN01 | 42 | -0,156 | 0,403 | -0,938 |
| MaOCEN04 | 42 | -0,149 | 0,408 | -0,937 |
| MaOCEN05 | 42 | -0,151 | 0,413 | -0,962 |
| MaOCEN07 | 42 | -0,136 | 0,415 | -0,941 |
| MaOCEN13 | 42 | -0,149 | 0,408 | -0,942 |
| MaOCEN14 | 42 | -0,135 | 0,415 | -0,940 |
| MaOCEN18 | 42 | -0,144 | 0,411 | -0,940 |
| MaOCEN20 | 42 | -0,137 | 0,414 | -0,940 |
| MaOCEN22 | 42 | -0,133 | 0,417 | -0,944 |
| Media | 42 | -0,147 | 0,409 | -0,941 |
| Desviación Estándar | | 0,052 | 0,028 | 0,026 |

FIT: Índice de Fijación Total
 F_{ST} : Índice de Fijación
 F_{IS} : Coeficiente de Inbreeding

Para elaborar el dendograma, se agrupó a las accesiones de *Musa spp.*, de acuerdo al nivel de resistencia que presentan hacia la infección de la Sigatoka Negra. Como se puede apreciar en la Figura 2, los genotipos susceptibles son genéticamente más cercanos a los genotipos tolerantes, y los genotipos hiper resistentes están genéticamente más lejanos de los genotipos susceptibles y tolerantes.

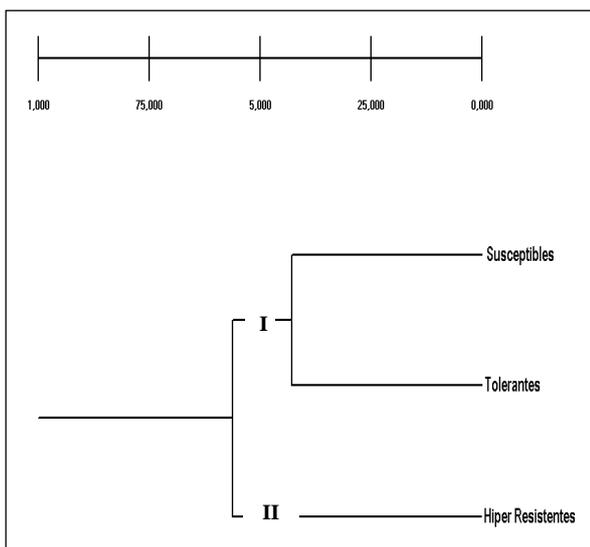


Figura 2. Dendrograma basado en Nei's (1978). Distancia genética de los genotipos de *Musa spp.*, según el nivel de resistencia a la infección de la Sigatoka negra.

Estos resultados sugieren que una alta diferenciación genética determina un alto nivel de resistencia hacia la infección de la Sigatoka Negra. Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios que nos permitan tener una mejor apreciación de la importancia que desempeña un alto nivel de diversidad genética en *Musa*.

Sería interesante complementar nuestro estudio realizando un análisis del polimorfismo del ADNcp (cloroplastos) a los 21 genotipos de *Musa spp.* Shepherd [27], Wong *et al.* [28] han reportado una significativa diferenciación genética en los cloroplastos usando marcadores moleculares AFLPs. Este estudio podría corroborar si efectivamente la diversidad genética está relacionada con el nivel de resistencia a la infección de *Mycosphaerella fijiensis*.

Es importante mencionar que el número de alelos encontrados en este estudio fue superior al número de alelos encontrados por Creste *et al.* [8] y Buhariwalla *et al.* [20]. Es posible que estas diferencias se deban a variaciones somaclonales, las cuales incluyen mutaciones puntuales, duplicación genética, rearrreglo de cromosomas y cambios en el número de cromosomas. Ge *et al.* [26] consideran que este tipo de variaciones puede ocasionar mutaciones, especialmente a nivel de los microsatélites.

Debido a las limitaciones que posee *Musa* para emprender programas de mejoramiento genético (carencia de inflorescencia y esterilidad) [21]. Seleccionar los mejores parentales de las principales variedades de banano cultivadas en el Ecuador (Gross Michel y Cavendish), en base al análisis del polimorfismo, podría incrementar la diversidad genética y lograría contribuir al mejoramiento genético de estos cultivos.

5. Conclusiones

En la mayoría de los loci el número de alelos encontrados fue mayor al número de alelos esperados, estas diferencias pueden haberse originado debido a que los iniciadores anillaron en regiones inespecíficas del ADN molde. Sin embargo, es posible que estas diferencias estén relacionadas a variaciones somaclonales que ocasionaron algún tipo de mutación puntual en los loci de los genotipos de *Musa spp.*, analizados. Los genotipos susceptibles son genéticamente más cercanos a los genotipos tolerantes, y los genotipos resistentes están genéticamente más lejanos de los susceptibles y tolerantes. Estos resultados sugieren que el nivel de resistencia hacia la infección de la Sigatoka Negra de los genotipos de *Musa spp.*, esta relacionado con los valores de diferenciación genética que presentan.

6. Agradecimientos

Al personal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por apoyarme en la realización de este trabajo, especialmente a la Doctora Esther Peralta, al M. Sc. Omar Ruiz y al Doctor Efren Santos. Quisiera agradecer también al Centro de Investigación Científica y Tecnológica (CICYT) por financiar parte de esta investigación.

7. Referencias

- [1] Martínez, L. Trabajo Flexible en las Nuevas Zonas Bananeras del Ecuador. Red de Bibliotecas Virtuales de Ciencias Sociales de América Latina y el Caribe, de la Red de Centros Miembros de CLACSO, 2004.
- [2] Chang, J. Efectos de la dolarización en el costo de producción de banano en el Ecuador. ACROBAT – Ecuador, 2000, pp. 6.
- [3] Chong, P., Rodriguez H. Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Provenientes de Haciendas Bananeras con Manejo Orgánico y Convencional. Revista Tecnológica ESPOL. Vol. 20, Nº 1, 2007, pp. 215-222.
- [4] El cultivo del Banano. SICA. Servicio de Información y Censo Agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador Programa Nacional del Banano. Disponible en

- <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfilesproducto/banano.pdf>.
- [5] Crouch, J., and Vuylsteke, D. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa spp.*). EJB Electronic Journal of Biotechnology. Vol.1, N°1, 1998, pp. 11 – 22
- [6] Kresovich, S., Szewc-Mcfadden, AK., Blick, S., McFerson JR. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet*, 1995, 91:206-211.
- [7] Carlier, J., Mourichon, X., González de León, D., Zapater, M.F. and Lebrun, M.H. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. *Phytopathology*, 1994, 84:751-756.
- [8] Creste, S., Benatti, T., Orsi, M., Risterucci, A., y Figueira, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a comercial cultivar of *Musa acuminata*. *Molecular Ecology Notes* 6. Brazil, 2006, pp. 303-306.
- [9] Crouch, J., Crouch, H., Constandt, H., Van Gysel, A., Breynne, P., Montagu, MV., Jarret, RL., Ortiz R. Comparison of PCR-based molecular marker analyses of *Musa* breeding populations. *Mol Breeding*, 1999, 5:233 – 244.
- [10] Johanson, A., and Jeger Johanson, A. and Jeger, M. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agent of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycological Research*, 1993, 97:670-674.
- [11] Crouch, J., and Vuylsteke, D. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa sp.*). EJB Electronic Journal of Biotechnology. Vol.1, No.1. Universidad Católica de Valparaíso – Chile, 1998, pp 11 – 22.
- [12] Aljanabi, S. Martinez, I. Universal and rapid salt – extraction of high quality genomic DNA for PCR – based techniques. *Nucleic Acids Research*, 1997. pp. 4692 – 4693.
- [13] Tautz, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polimorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* N° 17, 1989, pp. 6463 – 6471.
- [14] Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 2002, pp. 1 – 16.
- [15] Strand y colaboradores. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*, 1993, 365:274 – 276.
- [16] Yañez, V. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas*). Tesis de Grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú, 2002, pp. 15 – 24.
- [17] Rivera y Colaboradores. Isolation y characterization of polymorphic microsatellites in *Coco nucifera*. *Genome*, 1999, 42:668 – 675.
- [18] Dellaporta, S. Word, J. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reports*. N°1, 1983, pp. 19 – 21.
- [19] Datta, K. Torrizo, L. Tu, J. Oliva, P. Datta, K. Production and molecular evaluation of transgenic rice plants, IRRI Discussion Paper Series No. 21, International Rice Research Institute, PO Box 933, Manila, Philippines, 1997, pp 26-27.
- [20] Buhariwalla, H., Jarret, R., Jayashree, B., Crouch, J., and Ortiz, R. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana*. *Molecular Ecology Notes* 5. México, 2005, pp. 327-330.
- [21] Oreiro, C. Odunola, O. Lokko, Y. Ingelbretch, I. Analyses of B – genome derived simple sequences repeat SSR markes in *Musa spp.* *African Journal of Biotechnology*. Vol. 5, 2006, pp. 126 – 128.
- [22] Pappert, A. Hamrick, L. Donovan, L. Genetic variation in *Pueraria lobata* (Fabaceae), an introduced, clonal, invasive plant of the southeastern Unites States. *American Journal of Botany*, 2000, 87, 1240–1245.
- [23] Auge, H. Neuffer, B. Erlinghagen, F. Grupe, R. Brandl, R. Demographic and random amplified polymorphic DNA analyses reveal high levels of genetic diversity in a clonal violet. *Molecular Ecology*, 2001, 10, 1811–1819.
- [24] Stilwell, L. Wilbur, M. Werth, R. Taylor, R. Heterozygote advantage in the American chestnut, *Catanea dentata* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 2003, 90, 207–213.
- [25] Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*. 1965, 19: 395-420.
- [26] Ge, X. Liu, M. Wang, W. Schaal, B. Chiang, T. Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR – RFLP. *Molecular Ecology*, 2005, 14, 933 – 944.
- [27] Shepherd, K. Observation on *Musa* taxonomy. In: Identification of Genetic Diversity in the Genus *Musa*. Proceedings of International Workshop, Los Baños, Philippines. INIBAP, Montpellier, France, 1998, pp. 158–165.
- [28] Wong, C. Kiew, R. Loh, P. Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP. *Annals of Botany*, 2001, 88, 1017–1025.