

Análisis Genético de la Resistencia a Triazoles en Asilados de *Mycosphaerella fijiensis* para Poblaciones de Ecuador

Chávez, T., Chong, P., Ruiz, O., Peralta, L.
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
tachavez@espol.edu.ec

Resumen

*La enfermedad de la Sigatoka Negra genera grandes pérdidas para el sector bananero en Ecuador. Esta enfermedad es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*. El sistema de control convencional, para Ecuador determinado por el uso de fórmulas químicas, ha generado que la enfermedad muestre una resistencia hacia estos, que podría estar relacionado con cambios moleculares específicos en genes que ya han sido reportados en diferentes informes científicos. En el siguiente estudio se realizó en base a un análisis entre la variación genética de las poblaciones de Ecuador con la presión ejercida por el control convencional. Donde, se estudió la sensibilidad in vitro hacia dos tipos de fungicidas del grupo de los Triazoles (epoxiconazol y propiconazol) para un total de 60 aislados de distintas poblaciones de Ecuador y 6 cepas determinadas como referencia demostrando que no fue posible determinar los índices de LC-50 hacia el fungicida Propiconazol en algunos aislados, debido a ser mayores a 3.5mg/L, perteneciendo con mayor frecuencia a provincias donde existe mayor aplicación de fungicidas. Para la caracterización se utilizaron 30 marcadores microsatélites obteniendo un perfil genético de la poblaciones de Ecuador, la cual poseía una alta diversidad genética con valores de $h = 0.4202$ (diversidad genética de Nei's 1973), Índice de Shannon = 0.7766 y G_{st} de 0.2465, con una distancia genética baja entre las poblaciones del Guayas y El Oro de 0.12. Un número de 23 aislados fueron seleccionados para la secuenciación del gen CYP51, encontrando mutaciones en el gen CYP51 en las posiciones correspondientes de la proteína codificada G313A, D461Y, H463Y, N463Y y S463Y del Lanosterol 14 α desmetilasa, que se encuentran relacionadas con la resistencia en fungicidas del grupo triazol.*

Palabras Claves: Sigatoka Negra, *Mycosphaerella fijiensis*, Triazoles, Epoxiconazol, Propiconazol, CYP51.

Abstract

*The Black Sigatoka disease generates great losses to the banana sector in Ecuador. This disease is caused by the ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis*. The conventional control system for Ecuador determined by the use of chemical formulas has generated resistance to this pathogen, which could be related to specific molecular changes in genes that have been reported in various scientific journals. The following study was conducted based on an analysis of genetic variation among populations of Ecuador with the pressure exerted by the conventional control. Where, we studied the in vitro susceptibility for two types of fungicides from the group of triazoles (epoxiconazole and propiconazole) for a total of 60 isolates of different populations of Ecuador and 6 reference strains identified as showing that it was not possible to determine rates of LC-50 towards the fungicide propiconazole in some isolates, due to be greater than 3.5mg / L, most often belonging to the provinces where there is an increased use of fungicides. To characterize this, 30 microsatellite markers were used to obtain a genetic profile of the populations of Ecuador, which had a high genetic diversity values of $h = 0.4202$ (Nei's genetic diversity of 1973), Shannon index = 0.7766 and 0.2465 G_{st} of with a low genetic distance between populations of Guayas and El Oro 0.12. A number of 23 isolates were selected for the CYP51 gene sequencing, finding CYP51 gene mutations in the corresponding positions of the encoded protein G313A, D461Y, H463Y, S463Y N463Y and the Lanosterol 14 α demethylase, which are associated with resistance in fungicides triazole group.*

Keys Words: Sigatoka Negra, *Mycosphaerella fijiensis*, Triazole, Epoxiconazole, Propiconazole, CYP51

1. Introducción

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

Una de las enfermedades fúngicas más importante que afecta a las plantaciones de plátano y banano es la Sigatoka Negra, producida por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* causante de un gran impacto negativo en la producción y exportación bananera del Ecuador. *Mycosphaerella fijiensis* altera la capacidad fotosintética de la planta reduciendo así el crecimiento y calidad del fruto. (3) *M. fijiensis*, presenta dos estados, el estado perfecto de célula ascógena o sexual perteneciente a la clase Ascomycetae y el estado imperfecto de conidea o asexual perteneciente a la clase Hyphomycetae, por lo que es un organismo heterotálico con ciclos de reproducción sexual y asexual. El término heterotálico se refiere a una especie constituida por individuos autoestériles (autoincompatibles), que para la reproducción sexual requieren la unión de gametos compatibles, sin considerar la presencia de ambos órganos reproductores, masculinos y femeninos, sobre el mismo individuo. Puede también referirse a una especie en la cual los sexos se presentan en talos separados, de modo que para efectuar la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes. La recombinación heterotálica, crea un alto potencial para que ocurran cambios genéticos dentro de las poblaciones de *M. fijiensis*, lo que puede conducir a una rápida adaptación a cambiantes condiciones ambientales (3).

Generalmente el control de esta enfermedad se la realiza con fungicidas de acción sistémica, dentro de los cuales los grupos más usados de acuerdo a su modo de acción son: Carboxiamidas que inhiben la enzima succinato deshidrogenasa o complejo II (SDHI), fungicidas Strobirulinas o inhibidores de las quinonas externas de la membrana en el complejo III de la mitocondria (QoI), Triazoles que inhiben la Desmetilación del Esterol (DMI) y Amino Morfolinas (acción multisitio), las cuales actúan dentro del sistema de la planta. El uso excesivo de estos compuestos ha generado que en las plantaciones de banano y plátano exista una pérdida gradual de la sensibilidad del patógeno hacia estos fungicidas (4), generando de

manera simultánea impactos sociales y ambientales negativos como: contaminación del suelo por filtraciones, consecuente contaminación de las fuentes de agua potable y el deterioro de la salud humana. Datos presentados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), asegura que 355 mil personas mueren cada año intoxicadas por plaguicidas (5).

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

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

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

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

2. Materiales y Métodos

3.1 Obtención de Aislados

Para la realización del estudio se recolectaron un total de 60 aislados de diversos sectores del Ecuador, segregados por provincias (figura 1), donde los colores representan las zonas que fueron muestreadas, verde representa a la provincia de Esmeraldas, naranja a la provincia de Los Ríos, azul a la provincia de Guayas y rojo a la provincia de El Oro.

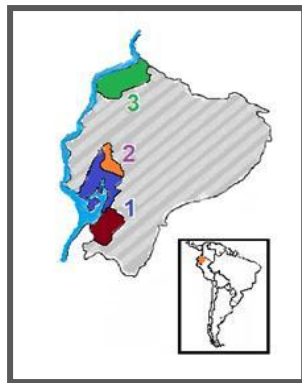


Figura 1 Mapa del Ecuador que muestra las zonas de Muestreo

Se recolectaron de 1-3 hojas por cada planta que se haya descrito como infectada y en estadio 6 de la enfermedad (12), las cuales fueron guardadas en sobre de papel, rotuladas de acuerdo a: lugar de toma de muestra, sector (ubicación dentro de la provincia), número de hoja (Figura 2) y número de planta dentro del sector, finalmente estos sobres fueron transportados al laboratorio para realizar la descarga de esporas.

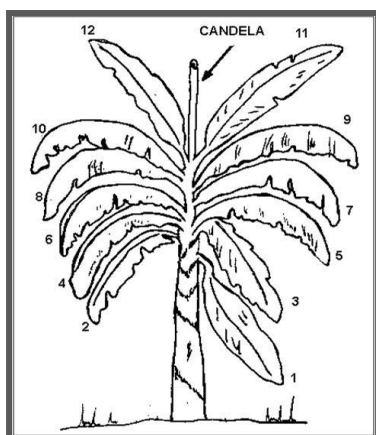


Figura 2 Hoja Candela o Cigarro de una planta de Banano y las numeraciones de sus hojas

La descarga de esporas se realiza recortando previamente pedazos necróticos de la hoja que han sido seleccionadas, siguiendo protocolo usado por el laboratorio de Fitopatología. Una vez seleccionada la espora objetivo para el estudio perteneciente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*, se colocó monospóricos por caja petri que contenían medio PDA, se dejó en una incubadora a temperatura de 32°C por alrededor de dos semanas o hasta obtener el crecimiento ideal.

3.2 Pruebas de Sensibilidad

Para la obtención de la dosis letal media (EC50) de cada uno de los aislados se realizó en base a ensayos descritos anteriormente por Cañas-Gutiérrez et. al. Y Pelaez et. al. (14, 15). Midiendo el crecimiento en placas de microtitulación a concentraciones de cada uno de los fungicidas Triazoles (Epoconazol y Propiconazol) a ser estudiados tales como: 0.0, 0.10, 0.17, 0.31, 0.56, 1.00, 1.78, 3.16 ppm respectivamente para cada uno.

Se realizó la inoculación en las placas con micelios de *M. fijiensis* a concentración por pocillo de 1×10^5 con los fungicidas a las concentraciones establecidas, se dejó incubar a 32°C por siete días, se leyeron los resultados con ayuda de un espectrofotómetro midiendo la absorbancia de la intensidad de luz reflejada a 690 nm. Los datos obtenidos fueron extraídos en Excel y se determinó el índice de LC-50 con ayuda del programa Kypplot v2.0 beta 13 disponible de manera libre en la web. Los valores de LC-50 encontrados para cada aislado se determinó la característica de susceptibles (≤ 0.10 mg/L), aislados considerados como tolerantes (0.19-1.15 mg/L) y aislados considerados como resistentes (≥ 1.32 mg/L). Luego de establecer las categorías para cada aislado se realizaron análisis mediante el programa de análisis estadístico "infoStat" (16), que se encuentra libre en la web www.infostat.com.ar, determinando la correspondencia de los aislados de acuerdo a sus características establecidas para dicha prueba.

3.3 Caracterización Molecular

Para caracterizar la población de Ecuador se determinaron como marcadores moleculares, a los arreglos de microsatélites establecidos para esta especie (17, 18, 19 y 20). Usando 30 pares de primers microsatélites, analizados con cada aislado obtenido de las diferentes poblaciones de Ecuador como de las

cepas determinadas como referencia. Siguiendo el protocolo de extracción determinado en el laboratorio de Biología Molecular del CIBE-ESPOL (21), se obtuvo el material genómico, colocándolo a una concentración de 10ng/μl para cada aislado. Los protocolos tanto de preparación de mix para PCR como programa para PCR fueron realizados mediante protocolos ya descritos por Chong, 2007 (13), con concentraciones finales de reactivos de buffer taq a 1X, Cloruro de Magnesio a 1.5mM, dNTPs a 0.2mM, primers a 0.24μM y taq DNA polimerasa a 1U/μl. Siguiendo el programa para PCR de un primer ciclo de 94°C por 4 minutos, un segundo ciclo de 94°C por 30segundos, 55°C por 45segundos y 72° por 45segundos repetidos 30 veces, un tercer ciclo de 72°C por 7minutos y 4°C en mantenimiento.

Los productos de PCR, obtenidos se revelaron mediante un gel de agarosa al 3%, teñido con SYBR Safe, donde los datos de los amplicones revelados medidos en pares de bases fueron extraídos, en diferentes archivos por marcador con los que se generó una matriz la cual fue analizada mediante el programa Popgene Version 1.31, Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, que se encuentra de manera libre en la web.

3.4 Secuenciación de aislados

La secuenciación se la realizó mediante ayuda del Laboratorio de Syngenta AG en Suiza y los servicios de MacroGen, siguiendo las especificaciones exigidas, para las amplificaciones específicas para el gen CYP51 y se enviaron los resultados. Una vez obtenidas las secuencias de los aislados escogidos entre las poblaciones de Ecuador estudiadas con mayor predominancia en conjunto con las cepas determinadas como referencia para este estudio, se realizó el análisis mediante el uso del programa CLC Genomics Workbench versión 4.8. Se generaron arboles filogenéticos basados en la secuencias tanto nucleótido como en su traducción a proteína (secuencia de aminoácidos). Para la obtención de estos árboles se generó en base el algoritmo de Neighbor Joining.

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

3. Resultados

3.1 Pruebas de Sensibilidad hacia los fungicidas

Los aislados analizados mostraron en su mayoría susceptibilidad hacia el fungicida epoxiconazol, donde solo un 5% de la poblaciones de Ecuador fueron resistentes hacia este fungicida, encontrándose solo en

Esmeraldas y Guayas, mientras que las poblaciones de El Oro y Los Ríos no presentaron ninguno que se muestre con características de resistencia hacia el mismo como se muestra en la Figura 3. Los aislados mostraron por lo contrario en su mayoría poseían características de resistencia para el fungicida propiconazol, estos se encontraban constituidos en un 40% en el grupo analizado, generalmente eran pertenecientes a las provincias de Guayas, El Oro y Los Ríos, donde existe un mayor número de ciclos de aplicación de esta fórmula química como se muestra en la Figura 4.

Al realizar un diagrama de barras de acuerdo a los índices de LC-50 para cada aislado se muestra que existen poblaciones donde los niveles de sensibilidad hacia el fungicida epoxiconazol son menores en su mayoría a 0.30mg/L, en la poblaciones de Ecuador, y los niveles más altos encontrados para este fungicida pertenecen a las cepas referencia provenientes de Costa Rica (Ca10_13 y Ca5_16) respectivamente mostradas en la Figura 5.

Se encontraron niveles de LC-50 mayores a



Figura 3 Diagrama de Sensibilidad hacia el fungicida Epoxiconazol en aislados de Ecuador



Figura 4 Diagrama de Sensibilidad hacia el fungicida Propiconazol en aislados de Ecuador

3,16mg/L hacia el fungicida propiconazol, en las poblaciones de Ecuador que pertenecían en su mayoría a las provincias de Guayas, El Oro y Los Ríos,

mientras que la provincia de Esmeraldas en su gran mayoría estaba constituida por aislados que se mostraron con índices bajos de LC-50 bajos determinándolos como susceptibles, tales como se

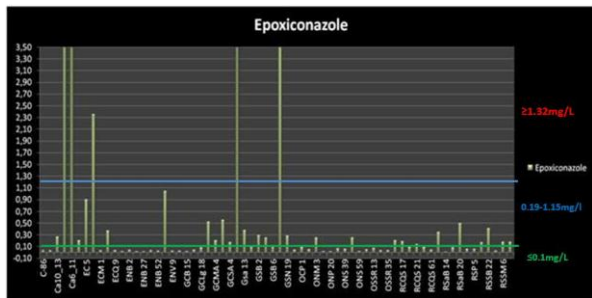


Figura 6 Diagrama de aislados con su respectivo LC-50 en mg/L para cada uno hacia el fungicida evaluado (Epoxiconazole)

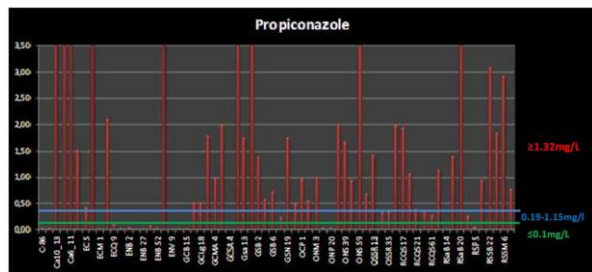


Figura 5 Diagrama de aislados con se respectivo índice de LC-50 en mg/L para cada hacia el fungicida evaluado (Propiconazol)

muestran en la Figura 6.

3.2 Caracterización Molecular

Se obtuvieron loci con un número de hasta 9 alelos, mostrando un alto polimorfismo, mientras que locus como MFSSR323, Mfsc20_2, Mfsc24_1 o Mfsc25_1, mostraron ser estables dentro de las poblaciones con un solo alelos para todos los aislados y donde la única variación se reflejaba en la inexistencia para el individuo del alelo, tal como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Frecuencia Alélica Para Loci

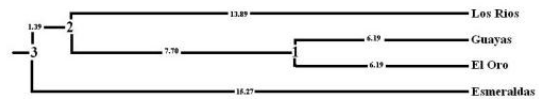
Allele Locus	VNTR_1333	MISSR244	MISSR405	MISSR423	Mfsc20_2	Mfsc22_2	Mfsc22_3	Mfsc22_4	Mfsc24_1	Mfsc24_2	Mfsc25_1	VNTR_3831
Allele 1	0.1000	0.0167	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000		0.1795	1.0000	0.0769	10000	0.3103
Allele 2	0.1333	0.1000					0.0196	0.1795		0.2308		0.0345
Allele 3	0.3333	0.0167					0.0196	0.0256		0.0769		0.1379
Allele 4	0.2333	0.1833					0.1569	0.0513		0.1538		0.2414
Allele 5	0.1833	0.1333					0.7451	0.0769		0.3846		0.2069
Allele 6	0.0167	0.3500					0.0588	0.1026		0.0769		
Allele 7		0.0833						0.1026				0.0690
Allele 8		0.1167						0.1026				
Allele 9								0.1795				

Estos resultados obtenidos, de cada uno de los primers microsatélites usados, se generaron diversos análisis donde los más importantes para el estudio es la distancia de las poblaciones y la variabilidad de los primers usados, como se muestran en la Tabla 1, la frecuencia alélica para cada uno de los loci determinados.

Se obtuvo que los aislados de Ecuador presentan una gran variación entre cada uno de acuerdo al polimorfismo que se halló, para cada una discriminando su lugar de procedencia. Pero al realizar un análisis entre las poblaciones se pudo observar que Ecuador posee una media de diversidad igual a 0,4202 para todos los loci, con una desviación estándar de 0,2974. Donde, la media de GST fue de 0.2465 y del flujo genético fue de 1.5286, que son los estadísticos que se han determinado para las poblaciones de Ecuador.

En el análisis de la identidad y distancia genética (Tabla 2) se puede observar la diversidad genética que existe entre las poblaciones del Ecuador para los loci estudiados, determinando una menor identidad con los aislados de la población de Esmeraldas en comparación con los aislados de las demás provincias del Ecuador.

Donde, dentro de la población del Ecuador existen sectores como Guayas y El Oro que poseen una distancia genética de 0.1237, ubicándolos como poblaciones muy similares. Lo que podría estar relacionado a la interacción indirecta y directa que existen entre las poblaciones, ya sea dada por el flujo existente de recursos humanos o por la distancia geográfica que mantienen estos dos sectores (22, 23). Se observa por lo contrario, sectores como Los Ríos y Esmeraldas con una distancia de 0.3264 determinándolos como poblaciones diferentes dentro de la escala genética de diversidad, relacionado a la influencia de acción química ejercida en la provincia de Los Ríos y a que el manejo de la enfermedad en Esmeraldas, está basado en el uso material orgánico y menos presión de cultivo, estas provincias se encuentran alejadas genéticamente del resto de la



población. (Figura 7).

Figura 7 Dendrograma Basado en la Distancia Genética según Nei's (1972)

Tabla 2 Distancia e Identidad Genética de Medidas Originales según Nei's

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

Tabla 3. Mutaciones de Aislados Secuenciados

Códigos	Epoxiconazol (LC-50)	Propiconazol (LC-50)	Mutaciones			
C-86	S (0,03)	S (0,04)				
Ca10_13	R (8,75)	R (6,73)	I18 T	D106 V	Y136 F	D463 Y
Ca5_16	R (20,68)	R (12,06)	I18 T	D106 V	Y136 F	
Ca6_11	T (0,20)	R (1,52)	I18 T	D106 V	Y136 F	D463 Y
E_22	S (0,02)	S (0,03)	I18 T	D106 V		
EC1	T (0,90)	T (0,42)		D106 V		
EC5	R (2,35)	R (89,93)		D106 V		
ENB1	S (0,04)	S (0,03)		D106 V		
ENB52	T (1,05)	R (34,44)		D106 V		
ENV9	S (0,03)	S (0,02)		D106 V		
GCMA4	T (0,55)	R (1,98)	I18 T	D106 V	G313 A	N463 Y
GCMS-7	T (0,17)	S (0,00)	I18 T	D106 V	G313 A	H463 Y
GCSB-13	T (0,37)	R (1,74)	I18 T	D106 V	G313 A	H463 Y
GSa13	S (0,10)	R (5,26)		D106 V	G313 A	N463 Y
GSB5	S (0,11)	T (0,72)		D106 V	G313 A	N463 Y
GSN1	T (0,28)	R (1,74)		D106 V	G313 A	N463 Y
ONM9	S (0,02)	S (0,03)		D106 V	G313 A	N463 Y
ONP-20	S (0,07)	R (1,99)	I18 T	D106 V	G313 A	D461 Y
OSSR-24	S (0,04)	T (0,33)	I18 T	D106 V	G313 A	N463 Y
RSaB14	S (0,08)	R (1,40)		D106 V	G313 A	N463 Y
RSaB6	S (0,06)	S (0,04)		D106 V		
RSSB-16	T (0,41)	R (3,09)	I18 T	D106 V	G313 A	N463 Y
RSSB-22	S (0,02)	R (1,82)	I18 T	D106 V	G313 A	S463 Y
RSSM-6	T (0,18)	T (0,76)	I18 T	D106 V	G313 A	N463 Y

3.3 Secuenciación de Aislados

Una vez obtenida la secuencia de los aislados, se observó que dentro de la población de Ecuador existe una alta variación en la secuencia de nucleótidos para cada uno de los aislados en el gen CYP51. Se encontraron mutaciones dentro de las secuencias que no pudieron ser relacionadas con la resistencia ya sea parcial o total hacia cualquiera de los fungicidas Triazoles tratados en este trabajo, debido a que dichas mutaciones (F18T y D106V) se encontraban tanto en las secuencias de aislados como resistentes, tolerantes o susceptibles.

Se realizó una traducción de la secuencia generando un información sobre los lugares de mutación importante para la producción de la proteína (Figura 8) los cambios relevante y posiciones que son necesarios como sitio de reconocimiento para la molécula del fungicida, (G313A, D461Y, D463Y, H463Y, N463Y, S463Y), en tres aislados en el sector del Guayas (GCMS-7, GCMA4, GCSB-13), dos aislados del sector de El Oro (ONP-20, OSSR-24) y cuatro aislados del sector de Los Ríos (RCQS-3, RSSB-16, RSSM-6, RSSB-22), para la población de Ecuador seleccionada para la secuenciación, donde en comparación con las pruebas de sensibilidad muestran una resistencia parcial o total a los compuestos estudiados, descritos de manera completa en la Tabla 3.

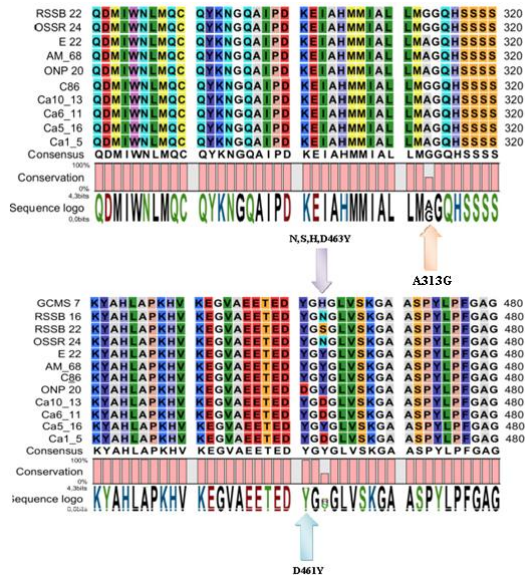


Figura 8. Mutaciones Encontradas en la Proteína CYP51

4. Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que no existe una resistencia cruzada entre los fungicidas estudiados, lo que puede ser validado debido a sus diferentes estructuras químicas, y el centro activo de acción con respecto a la proteína de reconocimiento, donde de acuerdo a los residuos reportados, son distintos tanto para el fungicida epoxiconazol, como propiconazol. A pesar de pertenecer al mismo grupo fúngico y tener la misma enzima objetivo su afinidad hacia esta es diferente para cada uno de los fungicidas químicos estudiados (24, 25).

Dos loci (MfSSR350, Mfsc13_1) no demostraron ser eficientes para la caracterización de las poblaciones de *M. fijiensis*.

Se encontró que existe una alta relación genética entre las poblaciones de las provincias de Guayas y El Oro, mientras que la población de la provincia de

Esmeraldas es la población genética y geográficamente más alejada del resto de las zonas, teóricamente la más cercana a la población original al ser el punto de entrada de la enfermedad en el Ecuador. (26, 27).

No existe una relación clara entre la pérdida de microsatélites con la ubicación del mismo en la secuencia del genoma de *M fijiensis*.

Existen mutaciones que no precisan una reacción de resistencia ante los fungicidas (I18T, D106V).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se identificó en los aislados de Ecuador la existencia de regiones mutantes (G313A, D461Y, D463Y, H463Y, N463Y y S463Y) que están relacionados con la resistencia de *M fijiensis* a Propiconazol.

Algunas de las mutaciones encontradas no parecen tener relación con la resistencia al Epoxiconazol. Es posible que otros mecanismos de resistencia estén involucrados en este caso.

5. Agradecimientos

Al Centro de investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL).

A la Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceanográficas y Recursos Naturales (FIMCBOR).

A Syngenta en especial a Gabriel Scalliet y a Christian Kunkel

6. Referencia

- [1] Aria, P., Dankers, C., Liu, C., Pilkaskas, P. (2004). La Economía Mundial Del Banano. Food and Agriculture Organization (FAO), www.fao.org.ec.
- [2] Martínez, L. (2004). Trabajo Flexible en las Nuevas Zonas Bananeras del Ecuador. Red de Bibliotecas Virtuales de Ciencias Sociales de América Latina y el Caribe. Red de Centros de Miembros de CLACSO.
- [3] Stover, R., and Simmonds, N. (1987). Tropical Agriculture Series. Longman Group UK, 468.
- [4] Anónimo. (2010). Fungicide Resistance Action Committee. Obtenido de FRAC Cod List: www.frac.info
- [5] Anónimo. (2003). Shaping the future. Geneva World Health Organization. Genova-Italy: The World health report.
- [6] Grünwald, N., Goodwin, S., Milgroom, M., and Fry, W. (2003). Analysis of Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. Blackwell Science Ltd., Phytopatology, 738-746.
- [7] Ausina, V., Morena, S. (2005). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Medicina Panamericana, 161.
- [8] Stammler, G., Carstensen, M., Koch, A., Semar, M., Strobel, D., and Schlehuber, S. (2008). Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and -field efficacy. Elsevier Ltd, 1448-1456.
- [9] Caña, G., Angarita, M., Restrepo, J., Rodríguez, P., Mor4eno, C., and Arango, R. (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistance isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. Society of Chemical Industry, 892-899.
- [10] Zhan, J., Linde, C., Jürgens, T., Merz, U., Steinebrunner, F., McDonald, B. (2005). Variation for neutral markers is correlated with variation for quantitative traits in the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella graminicola*. Molecular Ecology, 14, 2683-2693.
- [11] Fraaije, B. C. (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 α -demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides. Molecular Plant Pathology, 245-254.
- [12] MEREDITH D.S., LAWRENCE J. 1969. "Black leaf strike disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii and notes on the conidial state of the casual fungus." Transacciones de la Sociedad Británica de Micología. 52: 559-476
- [13] Chong, P. (2003) Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet Provenientes de Haciendas Bananeras con manejo Orgánico y Convencional. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, 4-44
- [14] Caña-Gutierrez, G. P., Patiño, L. F., Rodríguez-Arango, E. and Arango, R. (2006) Molecular Characterization of Benomyl-resistant Isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. Collected in Colombia. J. Phytopathology 154, 403-409
- [15] Pelaez, 2006
- [16] Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Rienzo J.A., Robledo C.W. (2008). Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- [17] Neu C, Kaemmer D, Kahl G, Fischer D, Weising K (1999) Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. Molecular Ecology, 8, 523-525.
- [18] Zapater, M., Duchemin, M., Dussart, J., Coste, D., Brottier, P, And Carlier J. (2008). Microsatellite markers for the fungal banana pathogens *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella eumusae*. Molecular Ecology Resources 8, 1121-1125
- [19] Garcia1, S., Van der Lee1, T., Ferreira, C., Te Lintel Hekkert1, B., Zapater, M., Goodwin, S., Guzmán, M., Kema, G., and Souza Jr. M. (2010). Variable number of tandem repeat markers in the genome sequence of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana (*Musa spp*). Genetics and Molecular Research 9 (4): 2207-2212

- [20] Jun Yang B., Bin Zhong S. (2008). Fourteen polymorphic microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology Resources*, 8, 910–912.
- [21] Romero, C. (2009). Análisis del Polimorfismo, Mediante el Uso de Marcadores SSRs, de Variación de *Musa spp.*, Resistentes, Tolerantes o Susceptibles a la infección de *Mycosphaerella fijiensis*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. 4-27
- [22] Anonimo. (2012). Comunicación Personal (Rufino Mesa).
- [23] Anonimo. (2012). Comunicación Personal (Carlos Arias).
- [24] Anónimos. 2006. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Propiconazole. EPA. 738P-06-027.
- [25] Anónimos. 2006. Pesticide Fact Sheet. Epoxiconazole. EPA. 7505P.
- [26] JIMENEZ M. 2008. “Effect of the nutritional status of Banana (*Musa spp.*) on leaf disease infestation by *M. fijiensis* Morelet in Ecuador”. Tesis para la obtención del grado de doctora en Bioingeniería.
- [27] SUQUILANDA, M. 2001. “Manejo Alternativo de Sigatoka Negra”. Cultivos Controlados. Volumen 3 # 5.