CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES MAT 1-1 Y MAT 1-2 DEL HONGO *Mycosphaerella fijiensis*, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA, EN LA PROVINCIA DEL GUAYAS

Julio Andrés Bonilla Jaime
Pablo Chong
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
bjulio_andres@hotmail.com

Resumen

El hongo Mycosphaerella fijiensis Morelet es el causante de la enfermedad foliar llamada Sigatoka Negra y ataca a las plantas de banano. La reproducción sexual de M. fijiensis se da por compatibilidad genética o tipo de "sexo o mating types". Esto quiere decir que sólo las líneas de "mating" genéticamente opuestas, son capaces de cruzarse y producir ascosporas. En estos hongos la compatibilidad sexual entre individuos haploides depende de los genes que se encuentran en el locus MAT que existe como dos alelos alternos Mat1–1 y Mat1–2. Este trabajo estudió los genes que actúan para que el apareamiento de M. fijiensis sea posible. Los aislados de M. fijiensis fueron pertenecientes a tres zonas de la provincia del Guayas (Taura, Balao y Mariscal Sucre) y se utilizaron primers específicos para amplificar las regiones de los alelos relacionados con la interacción sexual de las cepas de M. fijiensis. Los aislados de hongos fueron proporcionados por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) y se utilizó estos mismos aislados de con el objetivo de identificar a nivel molecular los tipos de alelos sexuales que se presentan en el hongo Mycosphaerella fijiensis. Se determinó la frecuencia que guardan estos alelos siendo esta de 2:1 entre Mat 1-1 y Mat 1-2 respectivamente. El análisis de estos resultados determinó que ni las condiciones de las zonas geográficas, ni la forma de manejar los cultivos en las que se encuentran las muestras afectan esta frecuencia. Estudiar y entender la reproducción sexual de M. fijiensis tiene una enorme importancia para poder contribuir en futuros estudios de prevención y tratamiento de la grave y cuantiosa enfermedad que provoca.

Palabras claves: *Reproducción sexual, Mycosphaerella fijiensis, compatibilidad genética, Mat1-1, Mat 1-2*

Abstract

Mycosphaerella fijiensis is the fungus responsible for the leaf disease known as Sigatoka Negra and which attacks banana plants. Sigatoka Negra is the most important disease in banana plantations. The sexual reproduction of Mycosphaerella fijiensis is given by genetic compatibility or mating types. This means that only the organisms that that genetically opposite mating types will be able to reproduce and produce ascospores. In heterothallic ascomycete fungus the sexual compatibility between haploid individuals depends on the genes located in the locus MAT in which exist two alternate alleles Mat 1-1 Mat 1-2. This research studied the acting genes for the sexual reproduction to be possible. The Mycosphaerella fijiensis isolates used where from three zones in the Guayas province (Taura, Balao and Mariscal Sucre) and where used specific primers for the amplification of the allele regions related with the sexual interaction. This isolates where given by CIBE (Centro de Investigaciones Biotecnólogicas del Ecuador). This thesis used the same isolates with the porpouse of indentifying at the molecular level, in the Guayas province, the sexual allele types presented in Mycosphaerella fijiensis. The determined frequency and proportion that these alleles have is 2:1 between Mat 1-1 and Mat 1-2 respectively. The analysis of the results determined that neither the geographic conditions nor the way the farm is controlled affects this frequency. To study and understand the sexual reproduction of Mycosphaerella fijiensis has an enormous importance to contribute in future studies of prevention and treatment in this terrible disease.

1. Introducción

El banano, junto con el arroz, trigo y maíz, se encuentra entre los cultivos de mayor importancia para la seguridad alimentaria a nivel mundial. En el Ecuador, existen alrededor de 180.000 hectáreas dedicadas al cultivo de banano y plátano, productos que son en su mayoría exportados (11). En el 2007 la exportación de banano contribuyó con el 55% de los ingresos totales de las exportaciones tradicionales (11). Sin embargo, estos cultivos se han visto directamente afectados por la enfermedad denominada Sigatoka Negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. La Sigatoka Negra surgió en el Continente Americano en 1972 en el Valle de Sula (Honduras) y en el Ecuador se la detectó por primera vez en 1987 en las haciendas Tímbre, Flamingo y Victoria, localizadas al este de la provincia de Esmeraldas, cercanas a la frontera con Colombia (1,11). En la actualidad se ha extendido a todas las áreas bananeras del Ecuador continental, y ya se ha reportado su presencia en pequeñas áreas cultivadas en la provincia insular de Galápagos (1). A nivel mundial, la Sigatoka Negra se la puede encontrar en todas las zonas donde se realiza cultivos de banano, y es la enfermedad foliar de banano y plátano más seria en el mundo. La Sigatoka Negra ocasiona severos daños al follaje de la planta destruyendo su capacidad de fotosíntesis y respiración, reduciendo así el rendimiento y calidad de la fruta. El embate de esta enfermedad ha provocando pérdidas de más de 50% en la producción de las plantaciones (1,11).

2. Objetivos

2.1 General

- Analizar los genes Mat 1-1 y Mat 1-2 en *M. fijiensis.*

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar las poblaciones de *M. fijiensis* en la provincia del Guayas, mediante los genes de apareamiento.

- Estimar la distribución de las frecuencias alélicas de los genes Mat 1-1 y Mat 1-2 de la especie *M. fijiensis* en la provincia del Guayas.

- Proveer colonias diferenciadas para cruces dirigidos.

3. Materiales y Métodos

El desarrollo de la presente investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), edificio PROTAL de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus "Gustavo Galindo" ubicado en el Km. 30.5 de la vía Perimetral, en la ciudad de Guayaquil, Ecuador.

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales

Los asilados de *M. fijiensis* fueron los utilizados en la investigación del Ing. Chong en el 2007 (9) y obtenidos del banco de ADN del CIBE. Las cepas estuvieron localizadas en 3 diferentes zonas de la provincia del Guayas: Los aislados de hongos monospóricos Silvestres (W), provienen de la zona conocida como Mariscal Sucre (S 2°6'45,91" W 79°30'13.27") del cantón Balao de una hacienda con manejo orgánico (OB) (S 2°50'16.90" W 79°45'03.80") y de otra con manejo convencional (CB) (S 2°53'50" W 79°42'21"). Los aislados de hongos monospóricos provinieron de haciendas localizadas cerca del cantón Taura con control convencional (CT) (S 2°18'35.76" W 79°44,3'53.48") y otra hacienda con manejo orgánico (OT) (S 2°15'35.37" W 79°42'34.58"), ubicada en el Km. 24 Vía Duran-Tambo.

El estudio se realizó tomando un aproximado de 15-18 aislados de hongos monospóricos de hojas de banano infectadas con Sigatoka Negra por ubicación, para lograr un total de 81 aislados de hongos monospóricos en la provincia del Guayas.

3.2 METODOLOGIAS

Se realizo la extracción de ADN de los aislados del hongo *M. fijiensis* siguiendo el protocolo de extracción de ADN descrito por el Dr. Efrén Santos (16).

3.2.1 Protocolo PCR

El kit utilizado para realizar la PCR fue de la marca INVITROGEN modelo "Platinum® PCR SuperMix High Fidelity".

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del tipo Multiplex para esta experimentación utilizó un protocolo con 2 diferentes pares de primers, en la misma reacción y de manera simultánea para amplificar las zonas de la caja alfa y la caja HMG (Fig. 1).

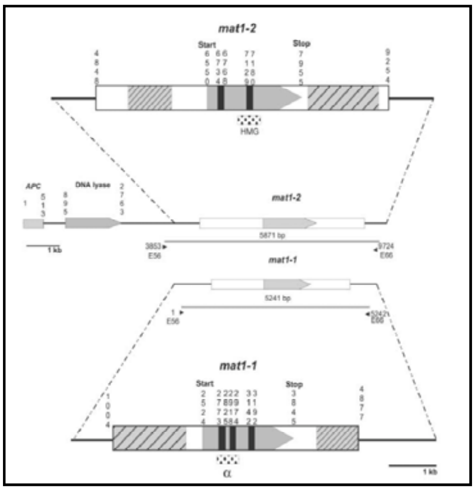

FIGURA No.1 Amplicones esperados del locus MAT de *M. fijiensis*

Los primers fueron tomados de un estudio preliminar (2) y son los siguientes:

1.- F1 flan4739-F
5′-GCGGTTTTGGAGCGGTCAGG-3′

2.- R1 inver5656-R
5′-GAAGCTCTGGGTATCTCAGCACAGG-3′

3.- F2 inver8486-F
5′-GCACCTCAGGGAGGCATTGG-3′

4.- R2 flan9352-R
5′-TGATGCATCCTGCCGAGACC-3′

Los amplicones esperados son descritos en la figura 2:

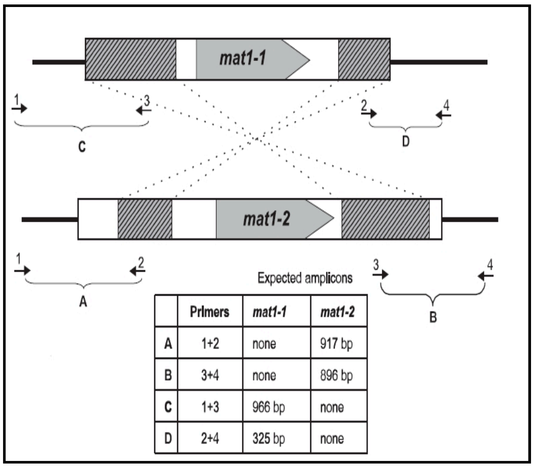

FIGURA No.2 Amplicones esperados para la PCR multiplex con los primers específicos de los alelos MAT

3.2.2 Análisis de datos

El análisis de los datos fue realizado utilizando el programa de análisis estadístico Infostat obtenido de la pagina web "www.infostat.com.ar" con la última versión del día 17 de diciembre de 2008 y se obtuvieron los resultados del X^2 de Pearson, tablas de contingencia y os intervalos de confianza.

4. Resultados y discusión

De los datos analizados se determinó que la relación entre los genes MAT 1-1 y MAT 1-2 es 2:1 respectivamente. La población analizada fue de 81 individuos obteniendo así 56 aislados de hongos monospóricos que poseían el alelo MAT 1-1 y 25 el alelo MAT 1-2 como se muestra en la tabla 1.

Lugar\Alelo	MAT 1-1	MAT 1-2	TOTAL
W	10	5	15
OT	12	6	18
CT	11	5	16
OB	11	5	16
CB	12	4	16
Total	**56**	**25**	**81**

TABLA No.1 Resultados de Muestras analizadas

Los gráficos 1 y 2 ilustran los tipos de alelos encontrados versus los tipos de tratamiento realizados a las muestras y los tipos de alelos encontrados versus la localización geográfica de las muestras, respectivamente:

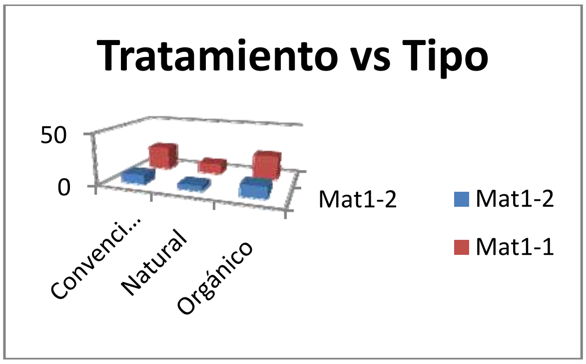

GRAFICO No.1 Gráfico del tratamiento de las muestras versus el tipo de alelo encontrado en los aislados de hongos.

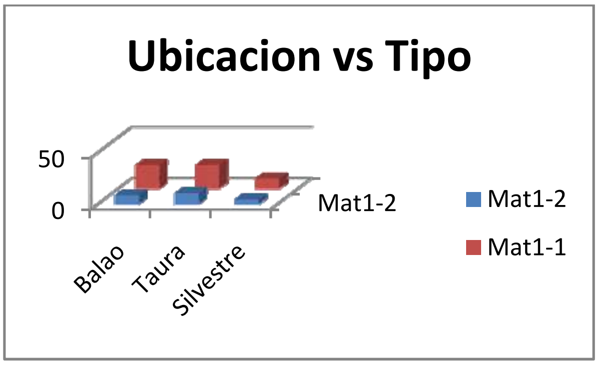

GRAFICO No.2 Gráfico de la localización de las muestras versus el tipo de alelo encontrado en los aislados de hongos.

A ambas relaciones se les aplico la prueba de X^2 de Pearson. La prueba de X^2 de Pearson es una prueba que se utiliza para probar la independencia de dos variables entre sí, mediante la presentación de los datos en tablas de contingencia. Mientras mayor sea el valor de X^2, menos verosímil es que la hipótesis sea correcta.

El resultado en las 2 relaciones analizadas se observó que son relaciones independientes y que él un factor no afecta al otro en su resultado.

La frecuencia alélica encontrado para los genes de apareamiento Mat 1-1 y Mat 1-2 fue de 0,69 0,31 respectivamente.

Los resultados obtenidos nos indican que indiferente de donde provengan las cepas de hongos y el tratamiento que estas reciban, esto no altera los alelos sexuales que la *M. fijiensis* tendrá. Estudios realizados en Costa Rica $_{(14)}$ sobre la frecuencia alélica de los genes de apareamiento en Sigatoka Negra dieron resultados diferentes a los obtenidos en la provincia del Guayas pudiendo esto deberse a factores como la situación climática y/o a la presión de selección ejercida por los controles orgánicos o por las sustancias químicas utilizadas contra la enfermedad en el país del norte que es mucho mayor a la de nuestra zona muestreada. Es importante acotar que los resultados obtenidos fueron de una sola provincia del Ecuador y comparados con los de un país.

Con estos resultados salta a la mente una pregunta muy importante: "¿Cuál es entonces la población efectiva de *M. fijiensis* en la provincia del Guayas?". Como todo en la naturaleza, nada es perfecto y por ende no todos los organismos disponibles para el apareamiento son hábiles sino que existirán algunos estériles, habiendo dicho esto y conociendo que en el Guayas la relación entre los genes MAT 1-1 y MAT 1-2 es 2:1 respectivamente, se puede decir entonces que en una población el número de la descendencia dependerá de los poseedores de los genes MAT 1-2, esto es porque al haber menos individuos con este tipo de alelo será un factor limitante, sin tomar en cuenta aún a los individuos estériles, indistintamente si estos son MAT 1-1 y/o MAT 1-2.

Este tipo de relaciones pueden llevar a la extinción de una especie ya que si la esterilidad se encontrara en los poseedores del alelo MAT 1-2 las posibilidades de reproducirse de manera sexual para el hongo *M. fijiensis* serían menores. Pero conocemos que *M. fijiensis* no se está extinguiendo y que es una enfermedad foliar que tiene mucha incidencia en la producción bananera de nuestro país, "¿Por qué entonces esta relación no afecta la existencia del hongo?". La respuesta puede deberse a que esta reacción es una manera del hongo de asegurar que la progenie sea la más apta para la sobrevivencia y esta cantidad de individuos es capaz de asegurar el futuro de *M. fijiensis*.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

1. La relación entre las frecuencias de los genes en los alelos sexuales MAT 1-1 y MAT 1-2 de *Mycosphaerella fijiensis* encontrados en la provincia del Guayas es de 2:1 respectivamente.

2. La relación encontrada entre las frecuencias de los alelos sexuales difieren de las reportadas según la literatura, que para el caso de Costa Rica fue de 1:1, publicada por el Dr. Gert Kema $_{(14)}$.

3. La existencia de los genes de apareamiento MAT 1-1 y MAT 1-2 evita la endogamia en la especie del hongo, alentando a la recombinación sexual de individuos no emparentados.

4. No existe una correlación directa entre el tipo de presión de selección , causada por el tipo de

control y/o la ubicación geográfica, y la proporción de la frecuencia de los alelos MAT 1-1 y MAT 1-2, que en todos los casos fue de 2:1, como se muestra en los análisis estadísticos con 95% de certeza.

5. No es posible discernir una relación entre el tipo de control y la ubicación geográfica con la proporción que existe entre los alelos MAT 1-1 y MAT 1-2.

5.2 Recomendaciones

1. Se debería realizar el experimento con un mayor número de aislados de hongos monospóricos y en más localidades para validar y ampliar los resultados obtenidos.

2. Realizar el estudio a nivel de toda la zona bananera del Ecuador para poder obtener resultados comparables con otras naciones.

3. Sería importante realizar estudios de recombinación sexual dirigida de *Mycosphaerella fijiensis*.

4. Se recomienda analizar cómo la relación de los genes de apareamiento de *Mycosphaerella fijiensis* afecta la población sexual efectiva de la misma.

6. Referencias

1. SUQUILANDA, M. 2001. "Manejo Alternativo de Sigatoka Negra". Cultivos Controlados. Volumen 3 # 5.
2. CONDE L, WAALWIJK C, CANTO B, KEMA G, CROUS P, JAMES A. y ABELN E. 2007. "Isolation and characterization of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana". Molecular Plant Pathology. Volumen 8(1), 111 – 120.
3. WARE S., DÍAZ – TRUJILLO C., KEMA G., VAN DER LEE T., DE WAARD M. 2006. "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, ISBN 90-8504-527-4 Chapter 2: 34, Chapter 5: 102 – 104; 114 – 119.
4. GALAGAN J., HENN M., MA Li-Jun, CUOMO C., BIRREN B. 2005. "Genomics of the fungal kingdom: Insights into eukaryotic biology". Genome Research. 15:1620-1631, 2005
5. RIVAS G, ZAPATER M, ABADIE C and CARLIER J. 2004. "Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fjiensis*". Molecular Ecology. Volumen 13 (2): 471.
6. SOUZA C, SILVA C, FERREIRA A. 2003. "Sex in fungi: lessons of gen regulation". Genetic Molecular Research. Volumen 2 (1): 136-147.
7. CARLIER J., LEBRUN M.H., ZAPATER M.F., DUBOIS C., MOURICHON X. 1996. "Genetic structure of the global population of Bananas black leaf streak fungus *Mycosphaerella fjiensis*". Molecular Ecology. 5:499-510
8. CONDE L. 2007. "El locus *MAT (mating-type)* de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación". Revista Iberoamericana de Micología. 24: 95-99
9. CHONG P. 2007. "Diversidad genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis Morelet* provenientes de haciendas bananeras con manejo orgánico y convencional". Tesis de grado para la obtención de magister en biotecnología agrícola.
10. BURT P.J.A. 2003. "Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*". 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases, San José (CRI), 2002/05/20-23.
11. 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.
12. The American Phytopathological Society. 2005. <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/BlackSigatokaEspanol/default.htm>
13. 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
14. KEMA G. 2008. "Molecular characterization of *Mycosphaerella fijiensis* isolates from Costa Rica". Comunicación personal del Dr. Gert Kema. Gert.kema@wur.nl.

Pablo Chong, M.Sc.
Director de Tesis.