



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Ciencias Biológicas

CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE TIPO  
SUSTRACTIVA POR SUPRESIÓN DE LA  
INTERACCIÓN TEMPRANA *in vitro* DE  
*Mycosphaerella fijiensis* CON *Musa acuminata* cv.  
GRAN ENANO

Tesis que presenta  
JOSÉ ANTONIO CRUZ GUTIÉRREZ  
En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS  
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México.

Mayo, 2014.





CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA DE TIPO SUSTRACTIVA POR SUPRESIÓN DE LA INTERACCIÓN TEMPRANA *in vitro* DE *Mycosphaerella fijiensis* CON *Musa acuminata* cv. GRAN ENANO fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

---

Dr. Felipe Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México. Mayo, 2014.



## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: José Antonio Cruz Gutiérrez.

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, con apoyo del proyecto de Ciencia básica "Caracterización de la pared celular y el exoproteoma de *Mycosphaerella fijiensis*, amplia área de oportunidades en la búsqueda de blancos moleculares para su control" cuyo responsable fue la Dra. Blondy Canto Canché (CB-54864) y forma parte del proyecto titulado "Aislamiento de genes específicos de *Mycosphaerella fijiensis* utilizando una biblioteca de ADNc" bajo la dirección de la Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García.

## AGRADECIMIENTOS

- Primeramente quiero agradecer profundamente a Jehová mi Dios por la oportunidad de vivir en estos tiempos que, aunque difíciles, me permiten conocer, admirar y maravillarme de su obra, cada día a cada momento puedo ver la perfección de su pensamiento y sigo sorprendiéndome, pues toda una vida no bastaría para conocer a fondo el delicado balance de las formas vivas que él ha creado.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo prestado para continuar mis estudios de posgrado a través de la beca 314019.
- A la Dra. Cecilia Mónica Rodríguez García por brindarme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación, gracias por sus consejos, asesorías y llamadas oportunas de atención, los cuales me han fortalecido como persona y sobre todo como profesionista.
- A los Dres. Blondy Canto e Ignacio Islas quienes además de fungir como miembros de mi Comité Tutorial, también hicieron el papel de profesores e incluso de compañeros de trabajo con los cuáles discutí en muchas ocasiones mis resultados y que muy amablemente me mostraron el camino a seguir cuando yo ya no lo veía, pues como dice la Dra. Canto “su labor era evitar que me suicidara” (en son de broma).
- A los miembros de mi Comité de evaluación, Dres. Cecilia Rodríguez, Blondy Canto, Marcela Gamboa, Elizabeth Ortiz e Ignacio Islas por todas las sugerencias y comentarios oportunos en la elaboración del presente trabajo.
- A la Dra. Blondy Canto Canché por el financiamiento parcial del presente trabajo a través del proyecto de Ciencia básica “Caracterización de la pared celular y el exoproteoma de *Mycosphaerella fijiensis*, amplia área de oportunidades en la búsqueda de blancos moleculares para su control”.
- Al Dr. Sáenz Carbonell y al equipo de posgrado por su constante apoyo para la finalización de este proceso académico.

- Al grupo del Dr. Prentis, en especial al Dr. R. Skye de la Universidad de Queensland, por toda su amable ayuda al aclararnos varias dudas sobre la brillante modificación que realizaron en la elaboración de una biblioteca sustractiva, su disposición y buena voluntad son un modelo a seguir para quienes pretendemos continuar el camino de la ciencia.
- Al Dr. Edgar Huitema de la Universidad de Dundee y al Dr. Sophien Kamoun del The Sainsbury Laboratory por su valiosa colaboración al donarnos el software para el análisis de origen de secuencias por GC<sub>3</sub>, que aunque por cuestiones de tiempo no fue posible implementarlo, estamos seguros que será de gran ayuda para futuras investigaciones.
- Al Dr. R. Maor del Department of Plant Sciences de la Universidad de Tel Aviv y a su grupo de investigación por su pronta asesoría sobre el uso del software PF-IND.
- Al Dr. Humberto Ramírez Prado y a su grupo de trabajo por el desarrollo del software pfectBLAST y las asesorías correspondientes para su uso.
- A los Dres. Luisa López Ochoa y Felipe Sánchez Teyer por el préstamo de la enzima T4 Cinasa sin la cual este trabajo no podría haberse terminado.
- A los técnicos del Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plátano: M. C. Bartolomé Chi, M. C. Miguel Tzec, QFB. Rosa Grijalva y M. C. Leticia Peraza, por sus consejos y ayuda constante, a veces hasta después de sus horas de trabajo, de todos ellos a quién más quiero agradecer es a la M. C. Leticia Peraza quien en incontables ocasiones me aleccionó y fungió como mentora de la biología molecular, por tus enseñanzas y por ser quien me ayudó en mis primeros pasos con esta gran área de la ciencia, muchas gracias.
- Al técnico del Laboratorio de Biorreactores M. C. Miguel Herrera por su ayuda en la primera etapa del presente trabajo y por su buen humor que lo caracteriza, el cual hizo más llevaderos muchos días de arduo trabajo.
- Al grupo de Computación del CICY por su gran disposición a ayudarme en las pruebas del programa CALcal.

- Al grupo de bibliotecarios del CICY, Licenciados Myriam, Judith, Narce, Sergio y Ofir, por soportar mis múltiples peticiones y en muchas ocasiones cumplir mis “caprichos” de conseguir información muy valiosa para este y otros trabajos de investigación.
- A todos mis profesores de la Unidad de Biotecnología quienes me instruyeron a un nuevo nivel en esta área y de cuyas clases me llevo gratos recuerdos.
- A mis profesores del Instituto Tecnológico de Conkal y de la Unidad de Bioquímica del CICY por su valiosa enseñanza de la materia de “Interacción molecular planta-patógeno”, en especial quiero agradecer a las Dras. Luisa López Ochoa y Ma. de Lourdes Miranda Ham ya que sus módulos fueron los que más disfruté en mi formación en el posgrado.
- A todos mis compañeros del posgrado pero en especial a los del Laboratorio 06 de la Unidad de Bioquímica y a los de los laboratorios de Bioinformática y Biotecnología Molecular de Plátano de la Unidad de Biotecnología del CICY.
- A mis amigos del CICY: Gabriela, Ángeles, Carlos, Victor, Abraham, Eduardo, Miguel, Inés, Efrén, Gabriela, Ioreni, Nuvia, Yeny, Abril, Muji, Xenia, Zamy, Rosa, Laura, Montserrat, Jorge, Carlos Alberto, Daniel, Aldo, Christian, Lilia, Marina, José Manuel, Lizandro, Roberto, Adrián, Yamily, Fernando, Erica, Frank, Alejandra, Gustavo, Yasmín, Mayra, Carmelita, Deisy, Alejandro, Omar, Sebastián, Laurita, Ernesto, Abril “mamá”, Ricardo, Israel y demás con los que compartí grandes momentos de alegría, espero no haber olvidado a ninguno.

## DEDICATORIAS

- Primeramente quiero dedicar este trabajo a mis padres sin cuyo esfuerzo, dedicación y aliento podría terminar esta etapa de mi vida, al ejemplo que ellos me han inculcado es que dedico el presente trabajo.
- En segundo lugar a mi abuelita Alicia Alfaro Candelaria quién con su inmenso amor supo guiarme desde pequeño, gracias mamá por tantos momentos de felicidad que aún me sigues dando.
- También dedico este trabajo a dos maestros que marcaron tanto mi formación como mi educación, a quienes siempre admiraré no sólo como docentes sino también como personas, a los M. C. Franciso Martínez y Gerardo Martínez, pues sin su apoyo y aliento no hubiera llegado a este nivel, los llevo en mi memoria como muestra de lo que un profesionalista debe de ser; ahora que soy docente trato de imitar su ejemplo y transmitir el amor por la ciencia y la curiosidad constante que uds. me inculcaron.
- Por último dedico éste trabajo a mis amigos Gabriela, Ángeles, Zamaria, Rosa, Fredy, Julio y Jorge quiénes nunca me abandonaron en esta travesía, por sus múltiples demostraciones de cariño, afecto y apoyo muchísimas gracias.

	<b>PÁGINA</b>
Índice.....	I
Listado de abreviaturas .....	VII
Índice de figuras .....	IX
Índice de cuadros.....	XI
Resumen .....	1
Abstract.....	3
1.- INTRODUCCIÓN .....	5
1.1.- ANTECEDENTES .....	7
1.1.1.- Generalidades del banano .....	7
1.1.2.- Cultivares del género <i>Musa</i> .....	8
1.1.3.- Importancia económica del banano.....	10
1.1.4.- Enfermedades del banano .....	12
1.1.4.1.- Descripción del género <i>Mycosphaerella</i> .....	15
1.1.4.1.1.- El complejo Sigatoka.....	16
1.1.4.1.1.1.- Biología de <i>M. fijiensis</i> y su interacción con <i>Musa acuminata</i> ..	17
1.1.5.- Descripción fisiológica y bioquímica de la infección temprana por hongos fitopatógenos.....	23
1.1.5.1.- Adhesión a la superficie del hospedero.....	24
1.1.5.2.- Germinación de la espora y formación del apresorio .....	25

1.1.5.3.- Penetración del hospedero .....	26
1.1.6.- Control de la Sigatoka negra .....	28
1.1.6.1.- Prácticas culturales .....	28
1.1.6.2.- Control químico y resistencia a fungicidas .....	30
1.1.6.3.- Control biológico.....	32
1.1.7.- Bioensayos utilizados para el estudio de la interacción <i>M. fijiensis</i> - <i>Musa sp.</i> .....	35
1.1.8.- Estudios moleculares de <i>M. fijiensis</i> .....	36
1.1.9.- Técnicas usadas para el estudio de expresión de genes.....	38
1.1.9.1.- Hibridación sustractiva por supresión.....	38
1.1.9.1.1.- Uso de la Hibridación sustractiva por supresión en el estudio de la interacción planta-patógeno .....	40
1.1.9.1.1.1.- Uso de la Hibridación sustractiva por supresión (HSS) para el estudio de genes que se expresan durante interacciones planta-patógeno en etapas tempranas. ....	42
1.1.10.-Técnicas de secuenciación .....	44
1.1.10.1.- Secuenciación clásica .....	44
1.1.10.2.- Secuenciación masiva.....	45
1.2.- JUSTIFICACIÓN .....	48
1.3.- OBJETIVO GENERAL .....	48
1.3.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48

1.4.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	48
1.4.1.- Etapa 1.- Interacción <i>in vitro</i> .....	48
1.4.2.- Etapa 2.- Generación de la biblioteca de ADNc por Hibridación sustractiva por supresión.....	49
1.5.- BIBLIOGRAFÍA.....	51
2.- INFECCIÓN DE <i>Musa acuminata</i> cv. Gran enano POR <i>Mycosphaerella fijiensis</i> EN CONDICIONES <i>in vitro</i> .....	75
2.1.- INTRODUCCIÓN.....	75
2.1.1.- Bioensayos para el estudio de la interacción <i>Mycosphaerella fijiensis</i> -Banano.....	75
2.1.1.1.- Cultivo de fragmentos foliares.....	76
2.1.1.1.1.- Aplicación del cultivo de fragmentos foliares en estudio de interacción planta-patógeno.....	78
2.1.1.1.1.1.- Aplicación del cultivo de fragmentos foliares en estudios de interacción Banano- <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....	78
2.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
2.3.- RESULTADOS.....	84
2.4.- DISCUSIÓN.....	87
2.5.- BIBLIOGRAFÍA.....	92
3.- CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA SUSTRÁIDA A PARTIR DE LA INTERACCIÓN TEMPRANA ENTRE <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Y <i>Musa acuminata</i> cv. Gran enano EN CONDICIONES <i>in vitro</i> .....	97

3.1.- INTRODUCCIÓN .....	97
3.1.1.- Expresión diferencial .....	97
3.1.2.- Extracción de ARN total .....	97
3.1.3.- Síntesis de ADN complementario (ADNc) por la técnica SMARTer™ ..	98
3.1.3.1.- Síntesis de ADNc de doble cadena .....	100
3.1.3.1.1.- Mezcla de polimerasas Advantage® cDNA .....	102
3.1.4.- Principio de la Hibridación Sustractiva por Supresión (HSS) .....	103
3.1.4.1.- Digestión .....	103
3.1.4.2.- Ligación .....	103
3.1.4.3.- Normalización y sustracción .....	104
3.1.4.4.- Amplificación por PCR y PCR anidada .....	105
3.1.5.- Limitaciones de la Hibridación Sustractiva por Supresión .....	105
3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	105
3.3.- RESULTADOS .....	109
3.4.- DISCUSIÓN .....	118
3.5.- BIBLIOGRAFÍA .....	125
4.- DISCUSIÓN GENERAL .....	131
4.1.- INTRODUCCIÓN .....	131

4.1.1.- Observaciones y limitantes de la experimentación con fragmentos foliares ..... 131

4.1.2.- Observaciones y limitantes de la experimentación en la construcción de la biblioteca sustraída por supresión..... 133

4.2.- CONCLUSIONES..... 134

4.3.- PERSPECTIVAS ..... 134

4.4.- BIBLIOGRAFÍA ..... 135



## LISTADO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
ADNc	ÁDN complementario	mg/kg	Miligramos por kilogramo
HSS	Hibridación sustractiva por supresión	PAL	Fenilalanina amonio liasa
spp.	Especie indeterminada	h	Hora
<i>M. musicola</i>	<i>Mycosphaerella musicola</i>	cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado
<i>M. eumusae</i>	<i>Mycosphaerella eumusae</i>	FHIA	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
<i>M. fijiensis</i>	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	mg/L	Miligramos por litro
ha	Hectárea	qPCR	PCR cuantitativa
a. e. c.	Antes de la era común	CIRAD	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
d. e. c.	Después de la era común	PR	Proteínas relacionadas a patogénesis
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	RH	Respuesta hipersensible
Tm	Tonelada métrica	RSA	Resistencia sistémica adquirida
Int.	Internacional	ERO	Especie reactiva de Oxígeno
VBTB	Virus Bunchy Top del Banano	pH	Potencial de Hidrógeno
VMH	Virus del mosaico de las habas	M	Molar
VRB	Virus del rayado del banano	MPa	Mega Pascales
VMP	Virus del mosaico del pepino	USD	Dólares estadounidenses
sp.	Especie	L/ha	Litros por hectárea
pv.	Patovar	RUBISCO	Ribulosa-1,5-Bifosfato carboxilasa oxigenasa
ITS	Espaciador transcrito interno	DMI	Inhibidor de la C14 $\alpha$ demetilasa
msnm	Metros sobre el nivel del mar	ppm	Partes por millón
°C	Grados Celsius	$\mu$ g/mL	Microgramos por mililitro
mm	Milímetros	MSA	Metil-S-acilbenzolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

---

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

BAC Cromosoma artificial bacteriano

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
HMG	Caja de alta movilidad	AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
SSR	Secuencia simple repetida	ARN	Ácido ribonucleico
ABC	Cassette de unión a ATP	SAGE	Análisis en serie de la expresión génica
pb	Par de bases	cv.	Cultivar
g/L	Gramos por litro	mL/L	Mililitros por litro
V8C	Medio V8 de crecimiento	V8E	Medio V8 de esporulación
mL	Mililitro	µm	Micrómetro
L	Litro	min	Minuto
µL	Microlitro	mm <sup>2</sup>	Milímetro cuadrado
ddi	Días después de inoculación	CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de Calcio
TM	Marca registrada	ARNm	ARN mensajero
PVP	Polivinil pirrolidona	SDS	Dodecil sulfato de Sodio
LiCl	Cloruro de Litio	kb	Kilobases
S	Segundo	Dr.	Doctor
Dra.	Doctora	Dres.	Doctores
µg/gpf	Microgramo por gramo de peso fresco	µg	Microgramo
ng/µL	Nanogramo por microlitro	ng	Nanogramo

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.-</b> Distribución geográfica de los ancestros de los bananos .....	9
<b>Figura 2.-</b> Ciclo de vida de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> y su interacción con <i>Musa</i> sp. ....	19
<b>Figura 3.-</b> Etapas del desarrollo de la Sigatoka negra en el banano. ....	20
<b>Figura 4.-</b> Esquematación de la hibridación substractiva por supresión .....	41
<b>Figura 5.-</b> Esquema del proceso de secuenciación por el sistema 454.....	47
<b>Figura 6.-</b> Esquema general de la estrategia experimental .....	50
<b>Figura 7.-</b> Estructura del Bencimidazol .....	78
<b>Figura 8.-</b> Fotografías y micrografías de fragmentos foliares de <i>Musa acuminata</i> cv. Gran Enano en condiciones control .....	85
<b>Figura 9.-</b> Fotografía y micrografías de fragmentos foliares de <i>Musa acuminata</i> cv. Gran Enano infectados con <i>M- fijiensis</i> cepa C1233 a 0 días de su inoculación.....	86
<b>Figura 10.-</b> Fotografía y micrografías de fragmentos foliares de <i>Musa acuminata</i> cv. Gran Enano infectados con <i>M. fijiensis</i> cepa C1233 a 3 días de su inoculación.....	86
<b>Figura 11.-</b> Fotografía y micrografías de fragmentos foliares de <i>Musa acuminata</i> cv. Gran Enano infectados con <i>M. fijiensis</i> cepa C1233 a 5 días de su inoculación.....	87
<b>Figura 12.-</b> Fotografía y micrografías de fragmentos foliares de <i>Musa acuminata</i> cv. Gran Enano infectados con <i>M. fijiensis</i> cepa C1233 a 10 días de su inoculación.....	88
<b>Figura 13.-</b> Fotografías de fragmentos foliares de <i>Musa acuminata</i> cv. Gran Enano cultivados en medio Agar .....	88
<b>Figura 14.-</b> Proceso de síntesis de ADNc .....	100
<b>Figura 15.-</b> Síntesis de ADNc de doble cadena.....	101
<b>Figura 16.-</b> Sitio corte de la enzima Mme I.....	106
<b>Figura 17.-</b> Sitio de corte de la enzima Rsa I.....	107

<b>Figura 18.-</b> ARN total extraído de fragmentos foliares control y fragmentos foliares infectados de 0, 3, 5 y 10 días .....	110
<b>Figura 19.-</b> ARN total extraído de conidios y micelio .....	110
<b>Figura 20.-</b> ADNc de una cadena de fragmentos foliares infectados y mezcla de material fúngico y fragmentos foliares control .....	111
<b>Figura 21.-</b> Prueba de ciclos óptimos para la síntesis de ADNc de doble cadena de mezcla de conidios-micelio y fragmentos foliares control.....	111
<b>Figura 22.-</b> Síntesis de ADNc de doble cadena del tester. Prueba de ciclos óptimos y Síntesis a 22 ciclos .....	112
<b>Figura 23.-</b> Amplificación de fragmentos de genes fúngicos y vegetales .....	113
<b>Figura 24.-</b> Digestión, purificación y concentración del ADNc del driver control, tester experimental y driver experimental.....	114
<b>Figura 25.-</b> Análisis de ligación del tester control .....	114
<b>Figura 26.-</b> Análisis de ligación del tester experimental.....	115
<b>Figura 27.-</b> Amplificación de la muestra control sustraída .....	116
<b>Figura 28.-</b> Amplificación de la muestra experimental sustraída.....	116
<b>Figura 29.-</b> Análisis de eficiencia de sustracción de tester control no sustraído y muestra control sustraída.....	117
<b>Figura 30.-</b> Prueba de eficiencia de sustracción de tester experimental no sustraído y muestra experimental sustraída .....	117
<b>Figura 31.-</b> Prueba de actividad de Cinasa T4 .....	118
<b>Figura 32.-</b> Electroforesis en gel de muestras de ARN total reportadas en el cuadro 18.....	121
<b>Figura 33.-</b> ADNc driver y tester de Ryang <i>et al.</i> , 2002 .....	121
<b>Figura 34.-</b> Primera y segunda amplificación de bibliotecas sustraídas .....	124
<b>Figura 35.-</b> Prueba de eficiencia de sustracción de Bitner-Eddy <i>et al.</i> (2003) y Batista de Souza <i>et al.</i> (2011) .....	124

	<b>PÁGINA</b>
<b>Cuadro 1.-</b> Descripción de los principales cultivares de banano en el mundo.....	8
<b>Cuadro 2.-</b> Frutos con mayor producción a nivel mundial.....	11
<b>Cuadro 3.-</b> Cantidad y valor de la producción de plátano por país.....	12
<b>Cuadro 4.-</b> Superficie cosechada, cantidad y valor de la producción de plátano por entidad federativa.....	13
<b>Cuadro 5.-</b> Superficie cosechada, cantidad y valor de la producción de plátano por municipio del Estado de Yucatán.....	14
<b>Cuadro 6.-</b> Clasificación taxonómica de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> y <i>Pseudocercospora fijiensis</i> .....	17
<b>Cuadro 7.-</b> Prácticas culturales usadas para el control de la Sigatoka negra.....	29
<b>Cuadro 8.-</b> Algunos grupos de fungicidas utilizados en programas de control de Sigatoka negra.....	31
<b>Cuadro 9.-</b> Casos de resistencia de <i>M. fijiensis</i> a fungicidas usados en programas de control de la Sigatoka negra.....	33
<b>Cuadro 10.-</b> Métodos de control biológico usados en el combate de la Sigatoka negra.....	34-35
<b>Cuadro 11.-</b> Principales estudios moleculares sobre <i>M. fijiensis</i> .....	36-37
<b>Cuadro 12.-</b> Técnicas aplicadas para la identificación de transcritos expresados diferencialmente.....	39
<b>Cuadro 13.-</b> Uso de la técnica de fragmentos foliares en diversos estudios de interacción planta-hongo.....	80
<b>Cuadro 14.-</b> Composición del medio de cultivo.....	81
<b>Cuadro 15.-</b> Composición del medio de cultivo V8E.....	82
<b>Cuadro 16.-</b> Comparación de la producción de conidios de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....	88
<b>Cuadro 17.-</b> Reactivos empleados en las técnicas de extracción de ARN de este trabajo y su efecto en las mismas.....	99

**Cuadro 18.-** Secuencia de los iniciadores diseñados por Prentis *et al.* (2010)..... 106

**Cuadro 19.-** Comparación de la concentración y pureza de ARN total extraído de fragmentos foliares..... 109

**Cuadro 20.-** Modificaciones al protocolo de síntesis de ADNc de doble cadena Advantage 2 para muestras de fragmentos foliares control y mezcla de conidios y micelio ..... 112

**Cuadro 21.-** Modificaciones al protocolo de síntesis de ADNc de doble cadena Advantage 2 para muestra tester..... 112

**Cuadro 22.-** Concentración y pureza de ARN total obtenida en otros trabajos..... 120

La Sigatoka negra es la enfermedad foliar más destructiva del cultivo del banano, la cual es ocasionada por un hongo ascomiceto que posee dos fases de reproducción, la sexual que es *Mycosphaerella fijiensis* y la asexual denominada *Pseudocercospora fijiensis*.

Esta enfermedad se registró por primera vez en 1963 en el valle de Sigatoka del cual tomó el nombre, a partir de entonces se ha extendido a todas las zonas productoras del mundo. En nuestro país se conoce desde 1981, cuando se reportaron los primeros casos en la zona de Tapachula, Chiapas.

Muchos de los cultivares comerciales de banano se ven afectados por esta enfermedad por lo que es necesario estudiar íntimamente al patógeno; en este rubro se ha avanzado en la aplicación de tecnologías recientes como el desarrollo de marcadores moleculares para estudiar las poblaciones de patógenos, el uso de transformación genética para estudios de genómica funcional, construcción de bibliotecas genómicas, entre otras herramientas.

Sin embargo, poco se sabe al respecto de cuáles son los genes que *M. fijiensis* expresa en las primeras etapas de infección; esta información, proporcionada por el ARNm, sería de gran utilidad para conocer (en parte) los procesos moleculares que se llevan a cabo en esta fase del ciclo biológico que podrían redundar en la producción de proteínas de interés para el desarrollo de mejores estrategias de control.

Es por ello que en este estudio se construyó una biblioteca de ADNc de la interacción temprana de *Mycosphaerella fijiensis* con *Musa acuminata* cv. Gran Enano utilizando la técnica Hibridación Substractiva por Supresión (HSS) y realizando modificaciones con la finalidad de enviarla a secuenciar masivamente por el sistema Roche/454.



Black Sigatoka is the most destructive foliar disease of banana cultivation, which is caused by the ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis*. This fungus has two stages of reproduction of which *M. fijiensis* is the sexual phase and *Pseudocercospora fijiensis* is the asexual.

This disease was reported by the first time in 1963 in the Sigatoka valley, from it tooks its name, since then it has spread to all growing areas around the world. In our country is known since 1981 when the first cases were reported in the area of Tapachula, Chiapas.

Many commercial banana cultivars are affected by this disease and it is necessary to study closely the pathogen, in this area there has been progress in the application of recent technologies such as the development of molecular markers to study populations of pathogens, the use of genetic transformation to functional genomics studies, genomic libraries construction, among other tools.

However, little is known about which genes of *M. fijiensis* are expressed in the early stages of infection, which would provide information about the putative proteins that could be found in this process and in the future could help to design molecular control strategies.

That's why in this study we consturcted a cDNA library of the early interaction of *Mycosphaerella fijiensis* conidia with foliar fragments of *Musa acuminata* cv. Great Dwarf by Suppression Subtractive Hybridization (HSS) with modifications to use the massive sequencing Roche/454 platform.



## 1.-INTRODUCCIÓN

El cultivo del banano (*Musa* spp.) es una de las principales actividades comerciales a nivel internacional, tan sólo después de productos como arroz, trigo y maíz. En muchos países en desarrollo, esta fruta sirve de alimento básico y sustento económico. Su cultivo se realiza principalmente en las zonas cálidas y húmedas alrededor de todo el mundo desde Asia hasta América; siendo este último continente donde se da la mayor producción para exportación (Trade and Market division, 2011).

Las variedades de banano que se cultivan comercialmente se reproducen vegetativamente (o asexualmente), es decir, todos los individuos de una plantación poseen el mismo material genético, esto ha ocasionado que el cultivo sea susceptible a una gran cantidad de enfermedades provocadas por diversos microorganismos entre los que destacan hongos fitopatógenos tales como: *Fusarium oxysporum* (agente causal del mal de Panamá) y el Complejo Sigatoka (Jones, 2000).

El Complejo Sigatoka está formado por tres especies del género *Mycosphaerella*: *M. musicola*, *M. eumusae* y *M. fijiensis*, siendo esta última la causante de alrededor de 50% de pérdidas de la producción (Carlier, 2000). Debido a su importancia se han realizado grandes esfuerzos para entender los mecanismos por los cuales logra una relación compatible con cultivares susceptibles (e. g. Gran Enano), sin embargo, aún no ha sido posible conocer mucho sobre los genes que controlan mediante su activación/inactivación el proceso de infección.

Durante el presente trabajo se construyó una biblioteca de ADNc de la interacción de *M. fijiensis* con *Musa acuminata* cv. Gran Enano utilizando la técnica de Hibridación Sustractiva por Supresión (HSS) y realizando modificaciones para enviarla a secuenciar masivamente por el sistema Roche/454.



## 1.1.-ANTECEDENTES

### 1.1.1.-Generalidades del banano

El banano (*Musa* spp.) es una planta herbácea, poliploide, monocotiledónea y perenne, perteneciente a la familia Musaceae, la cual está conformada por los géneros *Ensete*, *Musella* y *Musa* (de Langhe *et al.*, 2009).

La planta está formada por 3 partes importantes: el cormo y el sistema radicular, el racimo o inflorescencia y el pseudotallo con el sistema foliar. Las inflorescencias se caracterizan por tener en la punta flores masculinas, mientras que las flores femeninas se encuentran detrás de ellas (Asvanitoyannis, 2008).

El banano es cultivado en plantaciones permanentes y en pequeñas parcelas (replantadas cada 3 a 10 años); las plantaciones poseen una extensión de entre 50 a 300 ha con una infraestructura permanente de caminos, drenaje, irrigación, así como un sistema de cableado para el transporte de los racimos (Stover, 1986). En cambio, las pequeñas parcelas poseen menor extensión (de <1 ha hasta <50 ha), poca infraestructura, muchas veces las plantaciones son temporales y se rotan los cultivos se rotan a intervalos regulares, produciéndose en asociación con otras especies de interés agrícola (Stover, 1986).

El fruto del banano es generado a partir de partenocarpia (producción de fruto sin polinización) y es una baya con una cáscara exterior que posee mucho colénquima (tejido de sostén caracterizado por la presencia de células ricas en agua y sustancias pécticas), generalmente se producen en racimos de 10 a 20 bananos, dependiendo del cultivar, pueden haber entre 6 a 15 manos de frutos por planta (Daniells *et al.*, 2001 citado por Arvanitoyannis *et al.*, 2008; Arvanitoyannis *et al.*, 2008).

Se sabe que es nativo de India y Polinesia y que su centro de diversificación está ubicado en Indonesia y Malasia, distribuyéndose en ambientes de clima tropical o subtropical de todo el mundo (de Langhe *et al.*, 2010; Stover, 1980).

Los registros más antiguos sobre el cultivo del banano datan de cerca del 600 a. C. y provienen de India; en la región del mar Mediterráneo se empezó a rumorar la existencia de esta fruta hasta el 300 a. C., debido en gran parte por la actividad comercial

que se desarrolló en esa época. A partir del siglo X d. C. la planta se introdujo a Europa y en el siglo XVI mercaderes portugueses la transportaron desde África occidental hasta Sudamérica (Arvanitoyannis *et al.*, 2008).

### 1.1.2.-Cultivares del género *Musa*

Los cultivares conocidos son descendientes de individuos diploides de *Musa acuminata* Colla (genoma AA) y *Musa balbisiana* Colla (genoma BB). Simmonds *et al.* (1955), propusieron una clasificación para los genotipos comestibles dividiéndolos en clones AA, AB, BB, AAA, AAB, ABB, AAAA y ABBB dependiendo de la carga de los genomas de los progenitores. En el cuadro 1 se presenta un listado de algunos de los principales cultivares en el mundo.

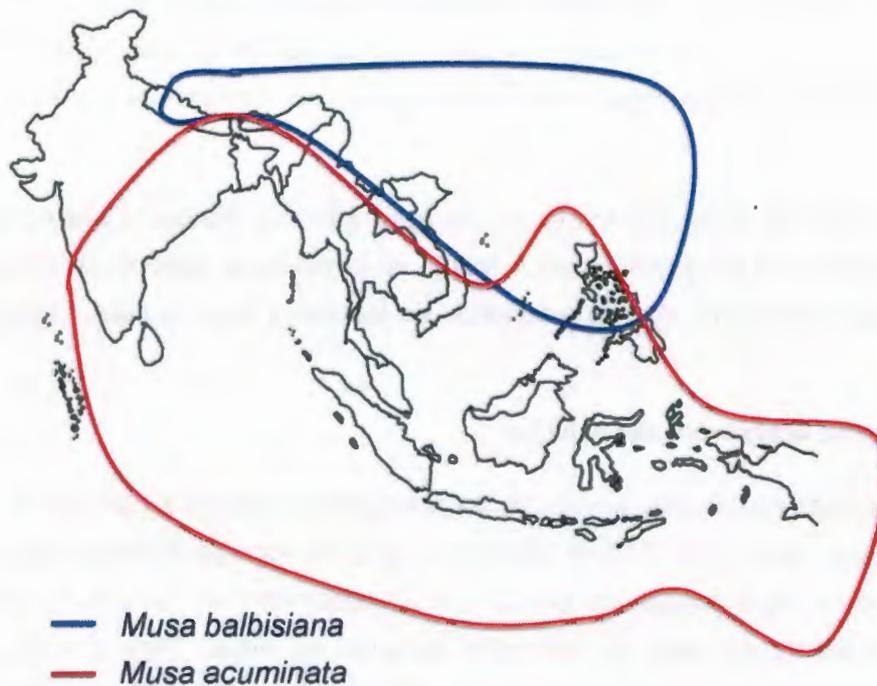
Cuadro 1.- Descripción de los principales cultivares de banano en el mundo (Arvanitoyannis *et al.*, 2008).

Tipo o especie (grupo genómico)	Cultivar	Características agronómicas y de calidad
Enano Cavendish		Características fisicoquímicas y sensoriales aceptadas
Robusta (AAA)	Valery	Racimos grandes y frutos de calidad
Lacatan (AAA)	Pisang	Aromático
Cavendish Nana		Altos rendimientos
Gigante Cavendish	Williams Gran Enano	Altos rendimientos, buenas características
Plátano (AAB)	Francés	De cocción
<i>Musa balbisiana</i> (ABB)	Bluggoe	Tolerancia a sequía
Enano Prata (AAB) x SH 3142 (AA) (AAAB)	Dedo dorado	Tolerancia a bajas temperaturas y sequía, resistencia al mal de Panamá

Según Ortiz [(1995) citado por Arvanitoyannis *et al.*, 2008], los cultivares triploides se originaron por cruzamiento de cultivares diploides con subespecies de *Musa acuminata*; este tipo de cultivares han reemplazado a los cultivares diploides en el sureste asiático de donde se cree que grupos nómadas provenientes de Australia los llevaron a áreas en las que predominaba *Musa balbisiana* (principalmente en India, Birmania,

Tailandia y Filipinas) con lo cual se originaron los híbridos AB, AAB y ABB (ver figura 1) (de Langhe *et al.*, 2009).

Este suceso propició que aquellos cultivares resultantes de los procesos de cruce adquirieran las características de *M. balbisiana*, entre ellas la tolerancia al estrés abiótico (Arvanitoyannis *et al.*, 2008), posteriormente se generaron nuevos subgrupos por mutaciones somáticas los cuales fueron seleccionados y dispersados con el paso del tiempo (de Langhe *et al.*, 2009; Arvanitoyannis *et al.*, 2008).



**Figura 1.-** Distribución geográfica de los ancestros de los bananos comestibles de la actualidad (adaptado de de Langhe *et al.*, 2009).

Los cultivares generados a partir de esta diversificación fueron los plátanos de Africa y los llamados “Maia maoli-Popoulu-Iholena” o plátanos del Pacífico, estos últimos fueron diseminados mayormente en el territorio de Oceanía; a partir de la plantación masiva de los cultivares africanos se originaron otros más, debido en gran parte a la acción del ser humano (de Langhe *et al.*, 2009).

Existen algunos autores como de Langue *et al.* (2010) que proponen que los fenotipos actuales de múltiples cultivares de banano son resultado de procesos más

complejos que aquellos explicados por Simmonds *et al.* (1955), ya que individuos de un mismo genotipo presentan un puntaje diferente de acuerdo a su morfología según la escala de estos últimos autores. Esto puede deberse a que en el proceso de formación de los nuevos cultivares no sólo el ADN nuclear jugó un papel importante, sino que también los genomas de los cloroplastos y las mitocondrias ayudaron a dar forma a los múltiples fenotipos vistos en la actualidad, sobre todo con las cruces que se dieron entre cultivares triploides y diploides y entre cultivares diploides (de Langhe *et al.*, 2010).

Además, restos fósiles de hojas y semillas de diversos cultivares han permitido aportar evidencia acerca de cuáles fueron las rutas de propagación del banano, las cuales estuvieron íntimamente relacionadas a las prácticas agrícolas y comerciales (Perrier *et al.*, 2011).

Como podemos notar el banano es un fruto con una historia estrechamente relacionada al desarrollo de la civilización humana, en la siguiente sección se detallarán los aspectos económicos que rigen la producción de banano a nivel mundial, nacional y local.

### **1.1.3.- Importancia económica del banano**

La producción de bananos es una de las principales actividades agrícolas a nivel internacional, según datos de la FAO, el banano ocupa el primer lugar entre los frutos con mayor producción a nivel mundial (cuadro 2) y el 4º lugar entre los cultivos con mayor importancia en países en vías de desarrollo después del arroz, trigo y maíz, con 102,114,819 toneladas, las cuales se producen mayormente en India, China y Filipinas (Food and Agriculture Organization, 2011; Arias *et al.*, 2003).

El banano es cultivado en más de 100 países (Arvanitoyannis *et al.*, 2008), de los cuáles México es el décimo productor (cuadro 3), con una producción mayor a la de países como Colombia, Tailandia y Costa Rica, entre otros.

En México el banano es uno de los principales cultivos, siendo más importante que la papa, cebolla, fresa, café entre otros (Food and Agriculture Organization, 2011; Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2010).

**Cuadro 2.-** Frutos con mayor producción a nivel mundial (FAO, 2011).

Fruto	Producción (Tm)
<b>Banano</b>	<b>106, 541, 709</b>
Manzana	75, 635, 283
Uva	69, 654, 926
Naranja	69, 605, 815
<b>Plátano</b>	<b>38, 901, 406</b>
Mango	38, 899, 593
Pera	23, 896, 556
Piña	21, 582, 237
Limón y lima	13, 861, 411
Papaya	11, 838, 651
Fresa	4, 594, 540
Aguacate	4, 434, 425

En el cuadro 4 se enlistan los principales estados productores donde se observa que Chiapas y Tabasco ocupan los primeros lugares, el estado de Yucatán aporta una cantidad considerable la cual es superior a la de entidades como Campeche, Morelos e Hidalgo por mencionar algunos; siendo el municipio de Akil el principal productor (cuadro 5).

Entre las principales variedades de banano cultivadas en México se encuentran el Manzano (AAB), Pera o cuadrado (ABB), Macho (AAB), Dátil o “Ciento en boca” (AA), Rombón o Rambao (AA), Roatán (AAA), Enano chaparro (AAA), Valery (AAA), Morado (AAA), Morado verde (AAA), Dominicó (AAB), Seda (AAB) y Enano gigante (AAA) (Vázquez-Castrejón *et al.*, 2005; Orozco-Santos *et al.*, 1983).

Según Fonsah y Chidebelu (2011) y Stover (1987), los principales factores que afectan la producción del banano son la irrigación, protección del fruto, fertilización, drenaje, clima, tecnología empleada y sobre todo protección contra plagas y enfermedades (principalmente Sigatoka negra), siendo este último aspecto el que genera más costos en la mayoría de las zonas bananeras (Manzo-Sánchez *et al.*, 2011).

Cuadro 3.- Cantidad y valor de la producción de plátano por país (FAO, 2011).

País	Producción (Tm)	Valor (miles de dólares Int.)
India	29, 667, 000	8, 355, 146
China	10, 705, 740	3, 015, 068
Filipinas	9, 165, 040	2, 323, 043
Ecuador	7, 427, 780	2, 091, 893
Brasil	7, 329, 470	2, 064, 205
Indonesia	6, 132, 700	1, 727, 158
República Unida de Tanzania	3, 143, 840	885, 402
Guatemala	2, 680, 390	726, 717
Angola	2, 646, 070	745, 215
<b>México</b>	<b>2, 138, 690</b>	<b>602, 321</b>
Colombia	2, 136, 110	541, 308
Tailandia	2, 036, 430	573, 521
Costa Rica	1, 937, 120	531, 471
República de Burundi	1, 848, 730	520, 659
Vietnam	1, 523, 430	429, 045
Camerún	1, 376, 000	387, 524
Kenia	1, 197, 990	337, 391
Egipto	1, 054, 240	296, 906
Papúa Nueva Guinea	1, 000, 000	253, 467
República Dominicana	829, 827	233, 705

#### 1.1.4.- Enfermedades del banano

Muchos de los cultivares de banano son afectados por una variedad de enfermedades pre y postcosecha de orígenes diversos, lo cual limita la producción y comercialización de los frutos. Las principales enfermedades del banano son causadas por virus, bacterias y hongos (Jones, 2000).

Dentro de las enfermedades producidas por virus, cuatro son las que predominan en la mayoría de los reportes, de ellas el "Bunchy top" es el más dañino (VBTB), el cual se encuentra mayormente en el hemisferio oriental (Ploets y Pegg, 2000).

**Cuadro 4.-** Superficie cosechada, cantidad y valor de la producción de plátano por entidad federativa (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2011).

Entidad federativa	Producción (ton)	Valor (miles de pesos)
Chiapas	792, 892.43	2, 022, 538.29
Tabasco	475, 612.77	1, 932, 597.70
Veracruz	270, 799.61	676, 687.35
Colima	150, 985.98	327, 143.75
Michoacán	142, 077.90	312, 292.92
Jalisco	81, 504.25	173, 474.03
Guerrero	73, 098.32	312, 011.50
Nayarit	66, 659.32	166, 823.36
Oaxaca	50, 090.95	154, 530.86
Puebla	29, 092.01	58, 500.48
Quinata Roo	2, 989.30	14, 203.13
<b>Yucatán</b>	<b>1, 286.80</b>	<b>5, 828.49</b>
Campeche	849.30	3, 730.57
Morelos	428.91	1, 394.76
Edo. de México	295.00	1, 252.50
Hidalgo	24.00	69.60
Tamaulipas	0.00	0.00

El mosaico de la bráctea, causada por el virus del mosaico de las brácteas del banano (VMBB) tiene una distribución más restringida al este y es menos destructivo. En contraste, el rayado del banano, originado por el virus del rayado del banano (VRB) y el mosaico del banano por el virus del mosaico del pepino (VMP), son considerados como daños menores en la mayoría de los casos (Ploetz y Pegg, 2000).

Entre las principales enfermedades bacterianas del banano están los marchitamientos vasculares originados por diversas especies del género *Ralstonia* y las podredumbres del rizoma y el pseudotallo causadas por *Erwinia* spp. A comienzos del siglo XX se reportaron epidemias de marchitamiento bacteriano ocasionados por

*Xanthomonas campestris* pv. *musarum* que hasta entonces no estaba considerada como enfermedad propia del género *Musa* (Thwaites *et al.*, 2000).

**Cuadro 5.-** Superficie cosechada, cantidad y valor de la producción de plátano por municipio del Estado de Yucatán (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2011).

Municipio	Producción (ton)	Valor (miles de pesos)
Akil	574.00	1,345.21
Peto	350.00	2,625.00
Oxkutzcab	84.00	189.00
Tzucacab	74.00	538.00
Tekax	70.00	560.00
Muna	40.00	114.40
Dzan	32.80	68.88
Chacsinkin	30.00	225.00
Tizimin	14.00	49.00
Tixmehuac	12.00	84.00
Tahdziu	6.00	30.00

Las enfermedades fúngicas se consideran las más importantes en el cultivo del banano debido a la magnitud del daño que provocan, entre los principales agentes causales se encuentra *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium musae*, *Cylindrocladium* sp. y el Complejo Sigatoka, el cual está formado por tres especies del género *Mycosphaerella*: *M. musicola*, *M. eumusae* y *M. fijiensis* (Carlier *et al.*, 2000; Ploetz y Pegg, 2000); esta última es la causante de la Sigatoka negra, la cual se considera que es la enfermedad foliar más importante del cultivo del banano (Marin *et al.*, 2003).

*M. fijiensis* fue reportado por primera vez en el valle de Fiji en el sur de Asia en 1963, sin embargo, se cree que su existencia se conocía desde 1927. Actualmente se encuentra distribuido alrededor del mundo en las principales áreas productoras de banano. En América se presentaron indicios de la infección en 1976 en Honduras, desde donde se diseminó la enfermedad hacia Belice, Guatemala, El Salvador, Nicaragua y Costa Rica (Churchill, 2011; Stover, 1980).

En nuestro país la Sigatoka negra ha infectado prácticamente todas las zonas productoras, iniciando en las regiones bananeras de Chiapas y Tabasco, para después establecerse en Oaxaca, Guerrero, Veracruz, Colima, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Yucatán, entre otras (Orozco-Santos, 1983).

#### **1.1.4.1.- Descripción del género *Mycosphaerella***

El género *Mycosphaerella* cuenta con cerca de 3,000 especies relacionadas con alrededor de 7,000 anamorfias; es uno de los géneros más amplios dentro del grupo de los ascomicetos, la identificación y clasificación de una especie dentro de este género se basaba en sus caracteres morfológicos macro y microscópicos. Sin embargo, con el tiempo se demostró que se requerían estudios moleculares para establecer los criterios de clasificación de nuevas especies (Crous *et al.*, 2011; Crous, 2009).

Los estudios filogenéticos basados en secuencias del gen que codifica para Actina determinaron que *Mycosphaerella* es un grupo monofilético, sin embargo estudios posteriores basados en la secuenciación de genes como *Lsu* permitieron demostrar el carácter parafilético del género el cual actualmente es dividido en siete secciones (*Mycosphaerella*, *Tassiana*, *Plaga*, *Fusispora*, *Caterva*, *Longispora*, *Plaga* y *Cymadothea*) (Crous, 2009; Crous *et al.*, 2009; Crous *et al.*, 2007).

Este género está formado por especies adaptadas a distintos ecosistemas, que van desde saprófitos, patógenos de plantas hasta hiperpatógenos. En cuando a su capacidad para infectar plantas, se sabe que *Mycosphaerella* spp. es de los fitopatógenos más comunes y destructivos, causando pérdidas considerables en cultivos de importancia como betabel, soya, fresa, cereales, cítricos y por supuesto en el banano (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010; Crous, 2009).

También se caracterizan porque el daño a las plantas comúnmente es debido a defoliación, lo que reduce la capacidad fotosintética del hospedero, con la consecuente reducción del crecimiento. Algunas especies como *M. citri*, pueden afectar hojas y frutos mientras que otras como *M. fijiensis* sólo afectan al tejido foliar (Crous, 2009).

#### 1.1.4.1.1.- El complejo Sigatoka

Dentro del género *Mycosphaerella*, tres son las especies que principalmente causan daños foliares al banano, éstas son *M. musicola*, *M. fijiensis* y *M. eumusae*, las cuáles en conjunto son conocidas como el “Complejo Sigatoka” (Arzanlou, 2008; Carlier *et al.*, 2000).

Estas especies presentan muchas características morfológicas y patogénicas similares, por lo que en campo resulta difícil distinguir cuál es el agente causando usando sólo los síntomas de la enfermedad (Arzanlou, 2008), e inclusive se puso en duda la existencia de *M. eumusae* como especie, por lo que Carlier *et al.* (2000) secuenciaron las regiones ITS 1 y 4 de distintas muestras provenientes del sur y sureste asiático así como también de África de las cuáles no se había determinado con certeza el agente causal de la enfermedad.

Al realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas de las muestras que habían sido clasificadas como infectadas por *M. musicola*, Carlier *et al.* (2000) descubrieron que se trataba de una nueva especie perteneciente al género *Mycosphaerella*, la cual denominaron como *M. eumusae* (por provenir de un hospedero de la sección *Eumusae* del género *Musa*). Asimismo determinaron que junto con *M. musicola* y *M. fijiensis*, *M. eumusae* formaba un clado claramente diferenciado de otras especies del género *Mycosphaerella*, por lo que posteriormente a este grupo se le denominó “Complejo Sigatoka”.

Crous y Mourichon (2002) determinaron que la anamorfa de esta especie pertenecía al género *Pseudocercospora* y no al género *Septoria* como originalmente habían propuesto Carlier y colaboradores (2000); también demostraron que los síntomas eran similares a las otras enfermedades de Sigatoka.

Aunque las tres especies del Complejo Sigatoka son capaces de infectar al banano y con ello, reducir el desarrollo de la planta y la producción de frutos, *M. fijiensis* destaca por su patogenicidad y virulencia, ya que en muchas zonas ha desplazado a *M. musicola* como patógeno principal, además de que se encuentra en todas las áreas bananeras del mundo.

1.1.4.1.1.1.- Biología de *Mycosphaerella fijiensis* y su interacción con *Musa acuminata*

*Mycosphaerella fijiensis* es un hongo ascomiceto, haploide y hemibiotrófico, con un sistema de reproducción heterotálico [las esporas sexuales presentan uno de los dos alelos del sistema de reproducción (Webster y Weber, 2007)]; cuyo anamorfo es *Pseudocercospora fijiensis*. Se caracteriza por crecer en regiones cálidas y húmedas con una altitud menor a los 500 msnm, con una temperatura óptima de crecimiento entre 20-25 °C (Churchill 2011; Orozco-Santos 1998). La clasificación taxonómica se presenta en el cuadro 6.

**Cuadro 6.-** Clasificación taxonómica de *Mycosphaerella fijiensis* (International Mycological Association; Schoch *et al.*, 2006) y *Pseudocercospora fijiensis* (International Mycological Association)

Categoría	Nomenclatura	
	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>
Dominio	Eukarya	Eukarya
Reino	Fungi	Fungi
Phylum	Ascomycota	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina	Pezizomycotina
Clase	Dothideomycetes	Dothideomycetes
Subclase	Dothideomycetidae	Dothideomycetidae
Orden	Capnodiales	Capnodiales
Familia	Mycosphaerellaceae	Mycosphaerellaceae
Género	<i>Mycosphaerella</i>	<i>Pseudocercospora</i>
Especie	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>

Dependiendo del proceso de reproducción, se generan dos tipos de esporas: ascosporas (reproducción sexual) y conidios (reproducción asexual); cuando germinan en la hoja comienza el desarrollo de tubos germinativos, los cuales se alargan y ramifican hasta que penetran a través de los estomas (Merchan, 1998).

Debido a sus características biológicas de mayor producción de ascosporas,

mayor número de ciclos sexuales por año y una tasa elevada de colonización de tejidos, *M. fijiensis* logró predominar rápidamente sobre otras enfermedades del banano menos agresivas (Romero, 2003).

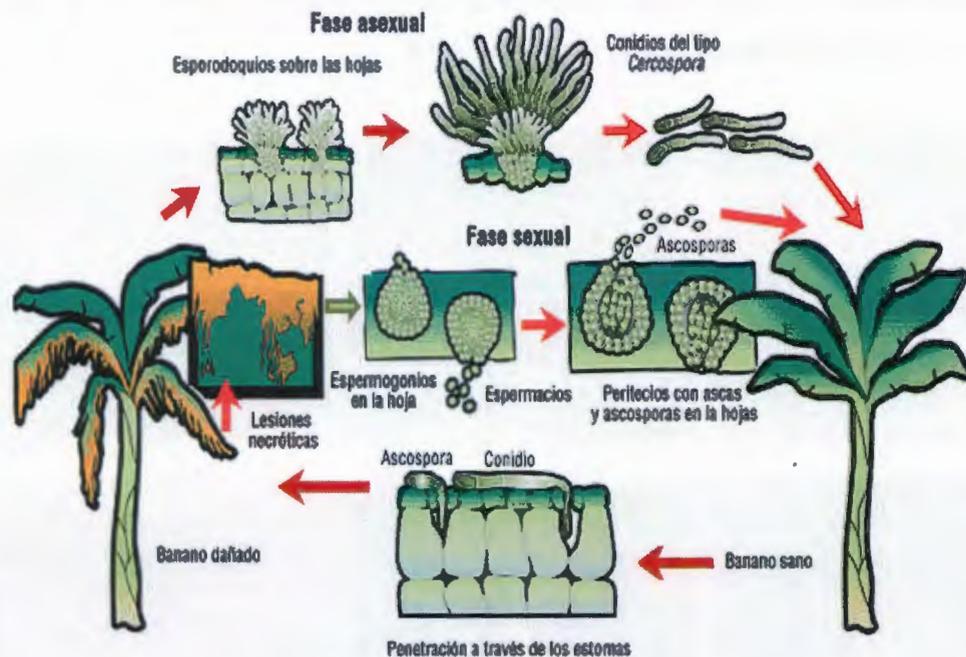
Hidalgo *et al.* (2006) señalan que durante el proceso de infección, la penetración mecánica por parte del hongo compromete el proceso fotosintético al reducir la conductividad estomática de la cual depende la tasa fotosintética; además, cada uno de los procesos que gobiernan el flujo de carbono vegetal (fotosíntesis, respiración, transporte, etc.) pueden ser afectados con la finalidad de favorecer la economía metabólica del patógeno. Estos autores señalan que durante los primeros síntomas de la enfermedad la tasa fotosintética neta foliar decae con el incremento de la severidad, lo cual se acentúa conforme avanzan las distintas etapas (las cuales se explicarán más adelante).

Rodríguez-Gaviria y Cayón (2008) y Hoss *et al.* (2000) demostraron a través del estudio de los efectos de ciertos metabolitos fúngicos, de la medición de variables fisiológicas del banano y de la degradación de carbohidratos de reserva en los tejidos de la planta, que posteriormente a la penetración se inicia un período de entre tres a cuatro semanas durante las cuales *M. fijiensis* se alimenta del almidón y azúcares libres sintetizados por la planta. El patógeno logra aprovechar estos nutrientes modificando el patrón de transporte de los fotosintatos a expensas de la destrucción del aparato fotosintético, provocando el aumento de la tasa respiratoria foliar y reduciendo la conductividad estomática (Hidalgo *et al.*, 2006; Meredith y Lawrence, 1970). Aunado a esto, el hongo puede reducir la cantidad de la Ribulosa Bifosfato Carboxilasa Oxigenasa (RUBISCO), alterar las relaciones hídricas foliares y consumir directamente proteínas y carbohidratos (Hidalgo *et al.*, 2006).

Una vez agotados los fotosintatos se inicia el metabolismo necrotrófico, durante estas etapas se generan las esporas tanto sexuales como asexuales las cuales son transportadas por diversos factores abióticos como el agua, el rocío y el viento a la hoja "cigarro" de la siguiente planta, iniciándose de nuevo el ciclo de infección y abarcando un perímetro de varias decenas de kilómetros alrededor del punto de infección. Los conidios juegan un papel importante en la infección dentro del cultivo, ya que al llover son transportados hasta otras plantas en la cercanía (Stover, 1980).

Un esquema que representa el ciclo de vida del hongo se presenta en la figura 2. Fouré (1985) agrupó los diversos signos y síntomas de la enfermedad en seis etapas en

las cuales tienen lugar distintos sucesos del ciclo de vida de *M. fijiensis*.

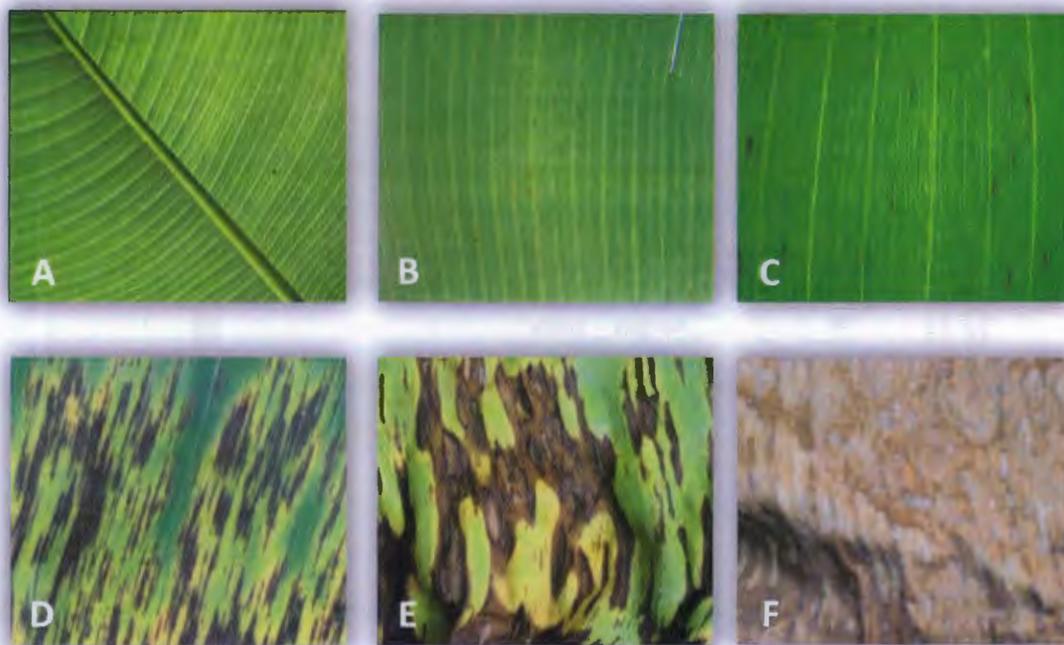


**Figura 2.-** Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* y su interacción con *Musa sp.* (Imagen tomada de [http://www.bayercropscience.co.za/crops/Bananas/Banana\\_disease.aspx](http://www.bayercropscience.co.za/crops/Bananas/Banana_disease.aspx), 2012).

En el estado inicial aparecen pequeños puntos amarillos de aproximadamente 0.25 mm de diámetro, durante esta etapa se empiezan a generar los conidióforos, éstos emergen por el envés de 1 a 4 unidades. En el primer estado de estría (etapa dos) se notan pequeños canales de 2 mm de largo color castaño en forma paralela a las venas laterales de la hoja. En la etapa tres o segundo estado de estría se observa un crecimiento de las mismas hasta alcanzar de 20 a 25 mm de longitud, también se nota una coloración marrón oscuro en el haz y amarillo en el envés. En esta etapa inicia la producción de conidios así como el desarrollo de espermogonios que producirán los gametos masculinos (Churchill 2011; Manzo-Sánchez *et al.*, 2005; Fouré, 1985; Meredith y Lawrence, 1969).

Los siguientes tres estados son considerados como de mancha, en la etapa cuatro, se observan manchas necróticas en el haz y en el envés y su perímetro se torna de color amarillo, en la etapa cinco se inicia el colapso del centro de la mancha y se forma un halo amarillo que rodea el borde acuoso de la mancha. En la etapa seis el centro de la

mancha se seca, adquiere un color gris claro y se torna comprimido (Churchill 2011; Manzo-Sánchez *et al.*, 2005; Fouré, 1985; Meredith y Lawrence, 1969). En la figura 3 podemos ver las distintas etapas de la Sigatoka negra.



**Figura 3.-** Etapas del desarrollo de la Sigatoka negra en el banano. Etapa 1 pizca (A). Etapa 2 o primer estado de estría (B). Etapa 3 o segundo estado de estría (C). Etapa 4 o primer estado de mancha (D). Etapa 5 o segundo estado de mancha (E). Etapas 6 o tercer estado de mancha (F): Tejido foliar completamente necrozado (Imagen A tomada de <http://www.travelphoto.net>, Imágenes B-F proporcionadas por Medina-Dzib, Peraza-Echeverría y Rodríguez-García, 2012).

De acuerdo con la respuesta que presentan ante la infección por *M. fijiensis*, la gran variedad de cultivares que existen en el género *Musa* se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellos que presentan tolerancia o resistencia a la infección y aquellos que son susceptibles a la misma (Torres *et al.*, 2009).

Los cultivares tolerantes o resistentes basan su defensa en diversos mecanismos: la resistencia parcial o tolerancia se encuentra ligada a la acumulación de compuestos fenólicos los cuales se concentran en células de parénquima (Torres *et al.*, 2009), disminución del número de estomas (Hernández *et al.*, 2006), engrosamiento de la

cutícula (Valerio *et al.*, 2002), entre otros. Los mecanismos de resistencia incluyen la confinación del patógeno así como la síntesis de diversos compuestos con actividad microbicida así como también la síntesis de diversas proteínas relacionadas a patogenicidad (proteínas PR) (Torres *et al.*, 2009).

En cuanto a la producción de compuestos tóxicos, los más citados en los reportes de interacción planta-hongo son las fitoalexinas, las cuales poseen un peso molecular bajo y se acumulan en los tejidos afectados (Torres *et al.*, 2009). Estos compuestos poseen estructuras muy diversas como fenilpropanoides, flavonoides, isoflavonoides, sesquiterpenos y policétidos (Taiz y Zeiger, 2010; Essenberg, 2001). Entre las fitoalexinas que presentan las especies del género *Musa* están el resveratrol, musanolonas y fenilfenalenonas; las cuales pueden actuar indirectamente formando especies reactivas de oxígeno que a su vez dañan algunos tipos de biomoléculas (proteínas, ácidos grasos, ácidos nucleicos, etc.) tanto del hospedero como del patógeno pero confinando de manera eficiente a este último (Quiñones *et al.*, 2000).

Otálvaro *et al.* (2002) demostraron que las fenilfenalenonas (y sus productos intermedios) poseen una buena correlación con el grado de resistencia de algunos cultivares, en su estudio estos autores encontraron que las concentraciones de fitoalexinas siempre eran mayores en las raíces que en las hojas independientemente de la resistencia o susceptibilidad de los cultivares y que los compuestos estaban presentes en casi todas las variedades analizadas. Sin embargo, estos autores observaron que dependiendo del cultivar, algunos compuestos eran sintetizados en mayor cantidad, siendo así que en la variedad Pelipita [*Musa acuminata* (ABB)] se encontró una mayor concentración (0.5-1 mg/kg) de 9-Fenilfenalenona anifigurona, 4-Fenilfenalenona irenolona y 4'-Metoxirenolona, las cuáles podrían estar relacionadas con la resistencia a *M. fijiensis*.

En cambio, cultivares como Gros Michel (AAA) o Dominico (AAB) presentaron una menor concentración de los compuestos antes mencionados (0.1-0.5 mg/kg) y mostraron mayor susceptibilidad ante el patógeno (Otálvaro *et al.*, 2002).

A nivel enzimático se ha observado la participación de múltiples catalizadores biológicos en la defensa contra *M. fijiensis*, Torres *et al.* [(2007) citado por Torres *et al.* (2009)] demostraron que durante la interacción del hongo fitopatógeno con el cultivar

Calcutta IV (AA) se incrementa la actividad de la enzima Fenilalanina amonio-liasas (PAL) (E. C. 4.3.1.5) durante las primeras 24 h posteriores a la infección mientras que en cultivar susceptible Williams (AAA) el aumento de actividad se da hasta seis días después; esta enzima está relacionada con la síntesis de varios tipos de fitoalexinas, incluyendo las que se mencionaron en párrafos anteriores.

Las proteínas relacionadas con patogénesis (PR), detectan factores de avirulencia presentes en el patógeno o elicitores, con lo cual inician la respectiva señalización que conducirá a que la planta active el mecanismo de Respuesta Hipersensible (RH) y la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) para defenderse del ataque del patógeno, algunas de ellas poseen actividad enzimática.

En banano se ha reportado que la proteína PR  $\beta$ -1,3- Glucanasa (E. C. 3.2.1.39), incrementa su actividad dentro de las primeras seis horas en el cultivar Calcutta IV una vez que el mismo es atacado por *M. fijiensis*, mientras que en cultivares susceptibles no se observa un aumento significativo (Torres *et al.* [(2007) citado por Torres *et al.* (2009)]).

Otras enzimas que participan durante la interacción planta-hongo son las peroxidasas, como producto de su actividad se liberan muchos compuestos fenólicos; en cultivares resistentes de banano se ha documentado el aumento de esta actividad enzimática dentro de las primeras 18 h después de la infección lo cual puede estar relacionado con el reforzamiento de la pared celular y la restricción del paso de toxinas fúngicas (Torres *et al.*, 2009).

Otro mecanismo involucrado en la defensa de ciertos cultivares de banano contra *M. fijiensis* son las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), las cuales son intermediarios tóxicos que resultan de la reducción paso a paso del oxígeno molecular (Mehdy, 1994).

Calderón y Arango. [(2004) citados por Torres *et al.* (2009)] observaron que en el cultivar Calcutta IV la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se da en las primeras 72 h, mientras que Cavalcante *et al.* (2011) reportan para el mismo cultivar que la producción de este compuesto se da hasta las 120 h, alcanzando un máximo a los diez días (144 h) posteriores a la inoculación, localizándose ésta en aquellos estomas donde *M. fijiensis* había penetrado. Estos autores también observaron que durante la interacción con el hongo, Calcutta IV mostró un engrosamiento de su pared celular en el sitio de infección,

así como también una menor área necrótica debido a la actividad fúngica, a diferencia del cultivar Gran Enano (AAA) el cual no mostró producción significativa de EROs y si una mayor área necrótica en los sitios donde *M. fijiensis* había penetrado.

A diferencia de los cultivares resistentes, en aquellos susceptibles los mecanismos de defensa no se activan o se activan en un período de tiempo tal que resulta imposible para la planta frenar el avance de la infección; debido a ello se han realizado estudios para aumentar la resistencia de genotipos susceptibles a través de distintas técnicas como el mejoramiento genético tradicional (Mobambo *et al.*, 1997; Ortiz y Vuylsteke, 1994), la inducción de variación somaclonal en cultivo *in vitro* (Nwauzoma *et al.*, 2002) y la ingeniería genética (Vishnevetsky *et al.*, 2011), con resultados alentadores.

Sin embargo también se ha observado que debido a las características del patógeno, la resistencia es abatida en poco tiempo por lo que es necesario continuar estudiando la relación entre estas dos especies para determinar a detalle cuáles son los factores involucrados en el proceso de infección, por lo que en la siguiente sección se describirá, usando a otras especies fúngicas como modelos, cuáles son los principales eventos que se dan durante la interacción planta-hongo.

#### **1.1.5.- Descripción fisiológica y bioquímica de la infección temprana por hongos fitopatógenos**

A pesar de que la Sigatoka negra ha afectado las plantaciones de banano del mundo por más de 40 años, poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales *M. fijiensis* se establece en el tejido foliar e inicia el proceso de infección. Sin embargo, diversos autores han descrito a nivel celular y bioquímico los principales sucesos que ocurren en las primeras etapas de infección de otras especies fitopatógenas, los cuales se presentan a continuación.

Dean (1997), definió al proceso de infección temprana a partir del momento en cual la espora del hongo patógeno aterriza en un hospedero. A partir de éste momento inician una serie de fenómenos fisiológicos y bioquímicos muy diversos controlados por proteínas que actúan directamente promoviendo o inhibiendo alguna función en particular o actuando como receptores de moléculas de bajo peso. Estos sucesos se agrupan en tres grandes categorías: Adhesión de la espora a la planta, germinación de la espora y

formación de una estructura similar al apresorio y por último penetración del hospedero (lo cual dependiendo del tipo de hospedero puede no ocurrir o, si ocurre, activar la rápida respuesta del mismo).

#### 1.1.5.1.- Adhesión a la superficie del hospedero

Después de que las esporas son transportadas por diversos factores hasta la superficie de un individuo susceptible, inicia la adhesión de las unidades infectivas a la misma. Para ello, las esporas pueden estar equipadas con un material mucilaginoso o, como en el caso de los conidios de *Nectria haematococca* y *Blumeria graminis*, iniciar la síntesis del mismo minutos después del contacto (Carver *et al.*, 1999; Epstein *et al.*, 1994; Jones y Epstein, 1989).

La composición del material mucilaginoso es muy variada aunque cabe destacar que en una gran variedad de esporas se ha determinado la presencia de una fracción proteica la cual tiene un papel fundamental en la adhesión a diversas superficies. También se han encontrado proteínas de bajo peso molecular y ricas en cisteína que tienen la capacidad de adherirse a superficies hidrófobas y cuya delección en *Magnaporthe grisea* redujo la hidrofobicidad de la superficie celular e impidió la formación del apresorio (Talbot *et al.*, 1996; Talbot *et al.*, 1993).

En *Colletotrichum graminicola* y *Magnaporthe grisea* se determinó la presencia de glucoproteínas cuyos residuos de manosa y ramnosa son fundamentales para la adhesión y formación del apresorio (Mercure *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1994).

La matriz extracelular secretada por esporas de *Uromyces fabae*, *Blumeria graminis*, *Pestalotia malicola* y *Uncinula necator* contiene la enzima cutinasa y otras esterases, las cuales cambian la hidrofobicidad superficial de la superficie vegetal y aumentan la adhesión (Gevens *et al.* 2001; Rumbolz *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 1998; Nicholson *et al.* 1993; Deising y Mendgen, 1992; Pascholati *et al.* 1992).

En *Erysiphe graminis* y *Colletotrichum graminicola*, se comprobó la presencia de actividades esterasa, invertasa, y  $\beta$ -glucosidasa, las cuales degradan la pared celular de la planta (Pascholati *et al.*, 1993; Nicholson *et al.*, 1988).

### **1.1.5.2.- Germinación de la espora y formación del apresorio**

Una característica de las esporas de hongos es su capacidad de dormancia, es decir, un período durante el cual la actividad metabólica es baja, lo cual les permite sobrevivir hasta que las condiciones de germinación sean las adecuadas (Hardham, 2007).

Los hongos saprófitos requieren de una fuente de externa para iniciar su germinación, sin embargo se ha observado que en el caso de hongos fitopatógenos las esporas germinan en ausencia de nutrientes exógenos lo que indica la presencia de una fuente interna de energía (Hardham, 2007).

La transducción de señales en hongos fitopatógenos está mediada por proteínas llamadas integrinas, éstas modulan su respuesta gracias a proteínas extracelulares llamadas vitronectinas y fibronectinas cuyos homólogos están presentes en hongos fitopatógenos como *M. grisea* (Dean *et al.*, 1994); también se han encontrado evidencias de la participación de proteínas G, MAP Cinasas y AMPc durante estos eventos (Doehlemann *et al.*, 2006; Osherov y May, 2001; Kinane *et al.*, 2000).

Takano *et al.* (2000) observaron que el gen *cmpk1* de *Colletotrichum lagenarium*, el cual codifica una MAP cinasa, está involucrado en el proceso de infección ya que su eliminación causa una reducción considerable en la conidiación y no permite que el hongo infecte a su hospedero; los autores descubrieron que las esporas de las mutantes no germinaban sobre superficies artificiales ni tampoco en tejido vegetal, concluyendo que esta proteína está involucrada en la regulación de este proceso.

Otra actividad importante que se ha determinado en esporas en germinación de *M. grisea* es la actividad cutinasa, la cual actúa degradando los enlaces presentes en la cutina, este polímero es el principal constituyente de la cutícula vegetal y está formado por ácidos grasos de cadena larga (principalmente palmítico y oleico) con grupos hidroxilos o epóxidos en la mitad o al final de la cadena, lo que permite su unión y la posterior formación de una red tridimensional de gran rigidez (Taiz *et al.*, 2010, Pascholati *et al.*, 1993).

Las señales que estimulan la germinación tienen una gran influencia en el desarrollo del hongo y su patogenicidad, en *Blumeria graminis* y *Colletotrichum gloeosporioides* se ha demostrado que la germinación de los conidios desencadena la formación del apresorio una vez que se tiene contacto con la superficie vegetal (Barhoom y Sharon, 2004; Wright *et al.*, 2000); sin embargo también se ha visto que en otras especies la germinación de la espora no necesariamente desencadena la formación de estructuras de infección (Hardham *et al.*, 2007). El apresorio permite al patógeno romper la cutícula y la pared celular de los tejidos vegetales a través de una combinación de presión y enzimas lignocelulolíticas (Hörbach *et al.*, 2011).

Se ha observado que la diferenciación del apresorio y la posterior penetración está acompañada por un patrón de secreción de hidrolasas pectin metil esterases y pectato liasas (Deising *et al.*, 1995); durante la producción de esta última enzima, *Colletotrichum* spp. produce amonio para alcalinizar el medio proporcionando el pH óptimo para su funcionamiento (Prusky *et al.*, 2001).

En *Uromyces viciae fabae* se han documentado actividades de proteasa y celulasa ácida, la evidencia experimental soporta la idea de que hongos fitopatógenos poseen receptores de moléculas presentes en la planta diana (Flaishman y Kolattukudy, 1994), esto con base en las observaciones presentadas en *M. grisea* cuyo apresorio se desarrolló en presencia de monómeros de cutina según Uchiyama y Okuyama (1990).

En el desarrollo de apresorios de *Pyricularia oryzae* se encuentran involucradas un gran número de enzimas, de las cuales se ha observado que las poliacétido sintasas (enzimas de la síntesis de melanina) juegan un papel importante en la funcionalidad de estas estructuras de infección, ya que su inhibición produjo estructuras que no podían interactuar con el hospedero adecuadamente (Howard y Valent, 1996; Woloshuk y Sisler, 1992; Kubo y Furusawa, 1991).

#### 1.1.5.3.- Penetración del hospedero

Durante la penetración del tejido vegetal los hongos fitopatógenos secretan una gran diversidad de proteínas. En el apresorio se han observado vesículas las cuales contienen enzimas degradadoras de la pared celular así como también efectores cuya

misión es evitar la activación de los mecanismos de defensa del hospedero (Hörbach *et al.*, 2011).

En algunos hongos fitopatógenos la síntesis de glicerol constituye uno de los elementos más importantes para la penetración del tejido vegetal ya que proporciona la presión suficiente para romper la barrera que significa la pared celular; en *M. grisea* se determinó que en el apresorio existe una concentración de 3.2 M de glicerol, la cual ayuda a generar 8 MPa, mientras que en otras especies como *Colletotrichum kahawae* y *Uromyces appendiculatus* esta molécula genera 2.6 y 0.35 MPa respectivamente (Chen *et al.*, 2004; de Jong *et al.*, 1997; Terhune *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1991).

La formación de estructuras infectivas y la síntesis de proteínas relacionadas con este proceso tales como efectores o enzimas degradadoras de la pared celular requiere, como se ha mencionado anteriormente, una gran cantidad de energía. En *M. grisea* las principales fuentes con las que cuenta la espora son el glucógeno, lípidos y la trehalosa; este último compuesto es uno de los más importantes durante el proceso de penetración del hospedero, ya que con base en el reporte de Foster *et al.* (2003), la eliminación del gen *tps1* que codifica la enzima Trehalosa-6-fosfato sintasa elimina la síntesis de trehalosa, con la consecuente pérdida de turgor en el apresorio.

Una vez que ha penetrado el hongo se forma una estructura de alimentación conocida como haustorio la cual se encuentra cercana a la membrana celular del hospedero. En la membrana haustorial se han identificado ATPasas las cuales acidifican el espacio entre ambas barreras, lo que permite la acidificación del medio y la formación de un gradiente de pH para con ello, dirigir el transporte de aminoácidos y azúcares hacia el exterior de la célula vegetal (Voegelé *et al.*, 2001; Struck *et al.*, 1996).

Sohn *et al.* (2000) observaron que durante la formación del haustorio de *U. fabae* se expresaron dos genes (*th1* y *th2*) que codificaban proteínas relacionadas con la ruta de síntesis de Tiamina (cofactor de enzimas participantes del metabolismo de aminoácidos y carbohidratos), los cuales constituían cerca del 5% del total del ARN mensajero.

Aunque ha habido un gran avance en el conocimiento de los principales sucesos de la infección temprana en otros patosistemas, poco se conoce en relación a *M. fijiensis*, esto ha provocado que las técnicas de control, sobre todo del control químico, se basen

en fórmulas que han servido en otros hongos fitopatógenos, las cuáles no han funcionado al nivel que se requiere, a continuación se profundizarán sobre los métodos usados para el control así como también aquellos que están en investigación.

#### **1.1.6.- Control de la Sigatoka negra**

Los principales métodos usados para el control de la Sigatoka negra son las prácticas culturales, el control biológico y el control químico, este último es el más utilizado ya que a nivel mundial se gastaron aproximadamente \$ 550, 000, 000 USD en compras de productos destinados al control de esta enfermedad (G. H. J. Kema citado por Churchill, 2011).

##### **1.1.6.1.- Prácticas culturales**

El control cultural de *M. fijiensis* consiste en reducir y eliminar las fuentes de inóculo del hongo, evitar las condiciones favorables para la reproducción del mismo, inducir el vigor en las plantas y establecer barreras físicas (Orozco-Santos *et al.*, 2008). Esto se logra a través de prácticas como el aumento del drenaje del suelo, una adecuada densidad de plantas, la eliminación de hojas enfermas, hijuelos y plantas cosechadas, una mejora en los métodos de riego, control de malezas y de la humedad relativa en la plantación, entre otras (Vicente-Lazo *et al.*, 2012; Orozco-Santos *et al.*, 2008; Pérez-Vicente, 2006).

El clima y la precipitación pluvial juegan un papel determinante en el control cultural de la Sigatoka negra ya que en regiones húmedas de precipitaciones durante todo el año la liberación del inóculo ocurre en casi todos los meses, caso contrario de aquellas zonas con clima seco y una temporada marcada de lluvias (Orozco-Santos *et al.*, 2002).

En el cuadro 7 se presentan las principales prácticas culturales reportadas para el combate de la Sigatoka negra. Las prácticas culturales, en conjunto, han funcionado de forma parcial, principalmente en lugares con abundante régimen pluvial el cual ha permitido crear las condiciones de humedad necesarias para el establecimiento y desarrollo del patógeno y en plantaciones con cultivares susceptibles a otros patógenos y plagas (Pérez-Vicente, 2006).

Cuadro 7.- Prácticas culturales usadas para el control de la Sigatoka negra.

Práctica cultural	Efecto sobre la Sigatoka negra	Referencias
Eliminación de hojas enfermas, hijuelos y plantas cosechadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reduce el período de esporulación de 20 a 3-6 semanas.</li> </ul>	Orozco-Santos <i>et al.</i> , 2008; Guzmán y Romero, 1995; Gauhl, 1994.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El deshoje disminuye hasta un 80% la severidad de la enfermedad.</li> </ul>	Orozco-Santos <i>et al.</i> , 2002.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El deshoje permite reducir la densidad poblacional, evitar la competencia por recursos nutrimentales, disminuir el área foliar y permitir una mayor ventilación.</li> </ul>	Orozco-Santos <i>et al.</i> , 2008.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La aplicación de urea al 5%-10% reduce hasta en un 80% la esporulación del hongo en <b>hojas cortadas</b>.</li> </ul>	Villalta y Guzmán, 2005; Guzmán y Romero, 1995.
Manejo del riego y drenaje	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El método de riego por goteo reduce la humedad excesiva en la plantación, la aparición de malezas y los síntomas de la enfermedad.</li> </ul>	Orozco-Santos <i>et al.</i> , 2008.
Resiembra y densidad	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Resiembras anuales o en</b> períodos de dos a cuatro años rompen el ciclo de la enfermedad.</li> </ul>	Orozco-Santos <i>et al.</i> , 2008.
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Manejo de 3,000-4,000 individuos/ha permiten un mejor manejo de la enfermedad, reducir la cantidad de fungicidas aplicados y aumentar el rendimiento.</li> </ul>	Álvarez y Beltrán, 2003; Belalcázar <i>et al.</i> , 2003.
Control de malezas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ayuda a aumentar la aireación, evita la acumulación de humedad, reduce la competencia por recursos y la propagación de inóculos.</li> </ul>	Orozco-Santos <i>et al.</i> , 2008; Orozco-Santos, 1998.

### **1.1.6.2.- Control químico y resistencia a fungicidas**

El manejo químico de la Sigatoka negra se ha realizado a través del uso de fungicidas de contacto y sistémicos, los cuáles pueden encontrarse en soluciones acuosas, en emulsiones aceite-agua o en mezclas con aceites minerales (Pérez-Vicente, 2006).

Los fungicidas de contacto se caracterizan por no penetrar en el tejido vegetal, su actividad sobre el patógeno se da evitando la germinación y abatiendo el crecimiento de los tubos germinativos así como también la formación de conidios debido a la contaminación de los conidióforos (Pérez-Vicente, 2006).

Por otro lado, los fungicidas sistémicos penetran las barreras de las células vegetales y se incorporan al apoplasto desde donde son translocados a diversos puntos de la planta, principalmente en aquellos donde la transpiración es mayor (Pérez-Vicente, 2006).

Dependiendo de la hidrofilia o lipofilia del ingrediente activo, éste puede ser absorbido y translocado con mayor rapidez al interior de la hoja; esto es muy importante ya que un adecuado programa de control de la Sigatoka negra a base de fungicidas sistémicos no sólo dependerá de la toxicidad de las moléculas sino también por el grado de translocación de las mismas (Pérez-Vicente, 2006).

En el cuadro 8 se citan algunos de los principales grupos de fungicidas usados en el control de la Sigatoka negra, sus características y compuestos representativos.

Antes de la llegada de la Sigatoka negra a América, el control de la Sigatoka amarilla (producida por *M. musicola*) requería de 10 a 14 aplicaciones de fungicidas al año mientras que para el control de *M. fijiensis* se requieren de 35 a 45 aplicaciones (Stover, 1986).

Cuadro 8.- Algunos grupos de fungicidas utilizados en programas de control de Sigatoka negra.

Grupo de fungicida	Propiedades y efecto sobre hongos fitopatógenos	Referencias	Ejemplos
Alquilenbisditio-carbamatos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reaccionan de forma inespecífica con los grupos tiol (-SH) causando el bloqueo de procesos metabólicos (Pérez-Vicente, 2006).</li> </ul>	Kaars-Sijpesteijn <i>et al.</i> , 1977	Mancozeb
Derivados de Phtalamidas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Reduce la cantidad de grupos tiol.</li> <li>Inhibe la producción de pseudotecios y germinación de esporas (Pérez-Vicente, 2006).</li> <li>Presentan baja solubilidad en agua</li> <li>Junto con el mancozeb fue uno de los principales fungicidas de los programas de control de la Sigatoka negra</li> <li>Resistencia al bencimidazol aumentó el consumo de clorotalonil de 15 a 25 L/ha</li> </ul>	Washington <i>et al.</i> , 1998 Pérez-Vicente, 2006 Vicente-Lazo <i>et al.</i> , 2012	Clorotalonil
Derivados del Bencimidazol	<ul style="list-style-type: none"> <li>El Benomil bloquea la formación de microtúbulos al unirse a la <math>\beta</math>-tubulina, inhibiendo la mitosis</li> </ul>	Pérez-Vicente, 2006	Benomil, Tiabendazol
Azoles y derivados	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhiben la síntesis del ergosterol</li> <li>Dos tipos principales: inhibidores de la C<sub>14</sub>-<math>\alpha</math>-demetilasa (DMI) y las aminas cíclicas.</li> <li>Los DMI bloquean la Citocromo P<sub>450</sub> C<sub>14</sub> demetilasa</li> <li>Son translocados rápidamente hacia las hojas.</li> <li>Las morfolinas afectan seriamente a la membrana celular (Pérez-Vicente, 2006).</li> <li>Las espiroquetalaminas inhiben la C<sub>14</sub> reductasa y la escualeno epoxidasa, reduciendo la capacidad de resistencia del patógeno.</li> </ul>	Sisler <i>et al.</i> , 1996 Sisler <i>et al.</i> , 1996 Pérez-Vicente, 2006 Cronshaw y Akers, 1990 Tiemann <i>et al.</i> , 1997	Propiconazol, Morfolinas
Anilinopirimidinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhiben la actividad de la Cistato-liasa, reduciendo la síntesis de Metionina afectando el desarrollo de tubos germinativos.</li> <li>Presentan una buena absorción dentro de la hoja y retención en la capa cerosa.</li> </ul>	Pontzen, 1997 González <i>et al.</i> , 2000	Pirimetanil

Las múltiples aplicaciones aunado a la capacidad de recombinación del hongo, lograron que éste adquiriera resistencia a muchos de los compuestos mencionados anteriormente, en el cuadro 9 se presentan algunos casos. De acuerdo con estos reportes, el control químico de *M. fijiensis* no sólo ha sido ineficaz, sino que también ha causado problemas de resistencia a los agentes e inclusive de aumento en la agresividad de las cepas, por lo tanto se han buscado nuevas alternativas basadas en el uso de la biotecnología para el control de la enfermedad.

### **1.1.6.3.- Control biológico**

Debido a los efectos que los agentes químicos pueden tener en la calidad de los frutos, en el ambiente y en la salud humana, la preocupación de los consumidores por tener métodos alternos de control de la Sigatoka negra ha aumentado (Pérez-Vicente, 2006).

Otros motivos que ha empujado al desarrollo de nuevos productos han sido el desarrollo de cepas resistentes a muchos agentes sintéticos que por años se manejaron sin regulación alguna en las plantaciones así como el aumento en el precio de los mismos, los cuales en muchos casos no pueden ser costeados por los pequeños productores (Pérez-Vicente, 2006).

Una de las formas novedosas de combatir la Sigatoka negra es el control biológico, el cual comprende un conjunto de técnicas y estrategias en las que se aplican agentes biológicos, partes de los mismos o productos derivados de su metabolismo (Vindas *et al.*, 2004). En el cuadro 10 se describen brevemente los logros obtenidos hasta el momento en materia de control biológico.

Como se ha descrito, existen diversas alternativas biológicas para el control de la Sigatoka negra, sin embargo, una gran parte carecen de estudios *in vivo* o aquellos que si los poseen, varían en las metodologías empleadas para determinar la actividad; por lo tanto, la siguiente sección abarcará las técnicas empleadas en los estudios de interacción Banano-*M. fijiensis*.

**Cuadro 9.-** Casos de resistencia de *M. fijiensis* a fungicidas usados en programas de control de la Sigatoka negra.

Fungicida	Descripción del estudio	Sitio de estudio	Referencias
Benomil	<ul style="list-style-type: none"> <li>Después de seis años de suspender la aplicación se encontraron aislados resistentes que presentaron menor tiempo de incubación y mayor agresividad en estudios de invernadero</li> </ul>	Costa Rica	Romero y Sutton, 1998
	<ul style="list-style-type: none"> <li>En 1998 se detectaron aislados resistentes y en el 2000 se suspendió oficialmente de los programas de control la utilización del Benomil</li> </ul>	Colombia	Chica <i>et al.</i> , 2004
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se determinó que el cambio en el codón 198 del gen que codifica la <math>\beta</math>-tubulina causa resistencia al fungicida</li> </ul>	Colombia	Cañas-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2006
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se aislaron cepas provenientes de plantaciones en cuyo historial hubo aplicación de Benomil capaces de crecer en medios con 10 ppm del compuesto</li> </ul>	México	Manzo-Sánchez <i>et al.</i> , 2012
Propiconazol	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aislados de <i>M. fijiensis</i> fueron capaces de crecer en medios con 1 <math>\mu</math>g/mL del fungicida</li> </ul>	Costa Rica	Romero y Sutton, 1997
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se sugirió que la resistencia al propiconazol podría estar relacionada con la resistencia al benomil debido al historial de aplicaciones en las plantaciones estudiadas, reduciendo el intervalo de aplicaciones de 16-18 a 10-12 días</li> </ul>	Costa Rica	Romero y Sutton, 1998
	<ul style="list-style-type: none"> <li>El período de lluvias crea condiciones favorables para la reproducción del patógeno, lo cual permite fijar en la población la resistencia al fungicida, observándose esto en la época de estiaje</li> </ul>	Colombia	Chica <i>et al.</i> , 2004
	<ul style="list-style-type: none"> <li>La resistencia se encontró en mutaciones en las posiciones 461 y 463 del gen <i>cyp51</i> el cual codifica una enzima relacionada con la demetilación del carbono 14 del eburicol, precursor del ergosterol</li> <li>Otros mecanismos de resistencia incluyen pérdida de afinidad del citocromo P<sub>450</sub>, procesos de detoxificación celular, sobreproducción de citocromo mencionado, inhibición de la activación del fungicida, expulsión del mismo, protonación, entre otros.</li> </ul>	Colombia	Cañas-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2009
Pirimetanil	<ul style="list-style-type: none"> <li>Otros mecanismos de resistencia incluyen pérdida de afinidad del citocromo P<sub>450</sub>, procesos de detoxificación celular, sobreproducción de citocromo mencionado, inhibición de la activación del fungicida, expulsión del mismo, protonación, entre otros.</li> </ul>	Cuba	Pérez-Vicente, 2006
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Genes que producen resistencia a otros DMI podrían estar involucrados en la resistencia a este fungicida</li> </ul>	Cuba	Pérez-Vicente, 2006

Cuadro 10.- Métodos de control biológico usados en el combate de la Sigatoka negra.

Método de control biológico	Descripción de los estudios y efecto sobre <i>M. fijiensis</i>	Referencia
Uso de organismos	• Aislado de <i>Pseudomonas sp.</i> con actividad similar al Clorotalonil.	Jiménez <i>et al.</i> , 1987
	• Ocho de 25 cepas de <i>Trichoderma spp.</i> mostraron inhibición completa <i>in vitro</i> de <i>M. fijiensis</i> , de las cuáles sólo dos mostraron capacidad inhibitoria en pruebas de invernadero.	Arzate-Vega <i>et al.</i> , 2006
	• La utilización de bacterias quitinolíticas en combinación con tratamientos químicos redujo la aplicación de fungicidas en un 46%.	Zuluaga-Amaya <i>et al.</i> , 2007
	• Bacterias aeróbicas formadoras de esporas de los géneros <i>Bacillus</i> y <i>Paenibacillus</i> colonizaron la superficie foliar y produjeron compuestos antifúngicos.	Ceballos <i>et al.</i> , 2012
Inductores de Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y nutrimentos	• El Metil-S-acibenzolar (MSA) en combinación con fungicidas indujo una mejor respuesta que cuando se aplicó solamente el control químico e incrementó el intervalo entre aplicaciones	Madrigal y Corrales, 2000
	• Las manchas que se presentaron en plantas tratadas con MSA perdieron sus márgenes y redujeron la velocidad de crecimiento.	Pérez, 2000
	• La combinación de MSA + fungicidas incrementaron un 50% el control de la enfermedad en comparación con el tratamiento convencional	Zuluaga-Amaya <i>et al.</i> , 2007
	• Calcio y Fósforo actuaron como inhibidores de enzimas pectinolíticas de <i>M. fijiensis</i> y permitieron el engrosamiento de la cutícula foliar	Pérez-Vicente, 2006
	• Mezclas de Calcio y Fósforo en combinación con fungicidas controlaron mejor la enfermedad, alargaron los períodos sin aplicaciones y redujeron el número de las mismas, además permitieron el crecimiento de las plantas, disminuyeron su estrés y aumentaron el tamaño de los racimos	Pasberg-Gauhl <i>et al.</i> , 2004
Aceites	• Silicatos de Calcio y Potasio incrementaron la producción de enzimas de defensa como quitinasas, glucanasas y peroxidasas	Pérez-Vicente, 2006
	• En plantas tratadas se redujo la germinación de conidios y la penetración	Pérez-Vicente <i>et al.</i> , 1981
	• El aceite de palma inhibió la germinación y esporulación	Pérez-Vicente, 2006

**Cuadro 10.-** Métodos de control biológico usados en el combate de la Sigatoka negra (continuación).

Método de control biológico	Descripción de los estudios y efecto sobre <i>M. fijiensis</i>	Referencias
Lixiviados de compostas	<ul style="list-style-type: none"> <li>El lixiviado de estiércol vacuno, melaza de caña y bacterias del suelo mezclado con aceite mineral disminuyó la aparición de manchas foliares</li> </ul>	Cañarte, 2003
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lixiviados de lombricultura indujeron RSA y presentaron microorganismos con actividad fungicida</li> </ul>	Zhang <i>et al.</i> , 1998
Péptidos antimicrobianos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Péptidos de <i>Impatiens balsamina</i> presentaron una mayor actividad fungicida <i>in vitro</i> que los controles positivos causando crecimiento anormal del tubo germinativo</li> </ul>	Vásquez <i>et al.</i> , 2009
Metabolitos secundarios	<ul style="list-style-type: none"> <li>Extractos de madera, bambú y cáscara de arroz presentaron actividad inhibitoria <i>in vitro</i> destacando el último a una concentración de 1%.</li> </ul>	Abiala <i>et al.</i> , 2011
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Extractos metanólicos de <i>Lycianthes acutifolia</i> y <i>Piper pesaresanum</i> y extractos diclorometánicos de <i>P. pesaresaum</i>, <i>Nectandra acutifolia</i> y <i>Ocotea paulii</i> inhibieron completamente la germinación de ascosporas, adjudicando la actividad a la presencia de fenoles, alcaloides y terpenos en los extractos.</li> </ul>	Niño <i>et al.</i> , 2011

### 1.1.7.- Bioensayos utilizados para el estudio de la interacción *M. fijiensis*-*Musa* sp.

En los estudios de interacción entre estas dos especies se han empleado múltiples técnicas que van desde el uso de sistemas *in vitro* como los fragmentos foliares y las plántulas provenientes de cultivo *in vitro* hasta plantas completas en invernadero y en condiciones de campo.

La utilización de los sistemas *in vitro* permitió determinar que los síntomas observados en estas condiciones fueron similares a aquellos reportados en campo, también se observó a nivel microscópico cómo *M. fijiensis* penetra en los estomas de la hoja iniciando la infección, y cómo los distintos cultivares de banano presentan diferentes respuestas al patógeno, correlacionando ésta con la actividad enzimática y la concentración de ciertas especies reactivas de oxígeno (Cavalcante *et al.*, 2011; Twizeyimana *et al.*, 2007). Estos resultados permitieron clasificar a los diversos cultivares

con base a su susceptibilidad o resistencia al hongo patógeno (Cavalcante *et al.*, 2011; Twizeyimana *et al.*, 2007; Fouré y Moreua, 1992).

En el capítulo II de este trabajo se amplía la discusión sobre las diversas técnicas usadas en los bioensayos en estudios de interacción planta-patógeno y en especial del patosistema *Musa acuminata-Mycosphaerella fijiensis*.

### 1.1.8.- Estudios moleculares de *Mycosphaerella fijiensis*

En el cuadro 11 se presentan un listado de las principales aportaciones de diversos grupos al conocimiento de las características moleculares de *Mycosphaerella fijiensis*.

Cuadro 11.-Principales estudios moleculares sobre *M. fijiensis*.

Referencias	Año de publicación	Descripción del estudio
Carlier <i>et al.</i>	2000	Definición del Complejo Sigatoka por estudios filogenéticos del ITS y del gen de la unidad 5.8S ribosomal
Balint-Kurti <i>et al.</i>	2001	Desarrollo del protocolo para transformación genética de <i>M. fijiensis</i>
Dagert <i>et al.</i>	2002	Elaboración de una biblioteca sustraída de la interacción de <i>M. fijiensis</i> y banano Yangambi Km5.
Islas-Flores <i>et al.</i>	2006	Elaboración de un método para la extracción de ARN total del hongo libre de melaninas
Rodríguez-García <i>et al.</i>	2006	Cariotipo de cepas mexicanas de <i>M. fijiensis</i> usando electroforesis en campo pulsante.
Sreeramanan <i>et al.</i>	2006	Transformación de banano con genes quitinasas y glucanasas para el control de la Sigatoka negra
Arzanlou <i>et al.</i>	2007	Detección de <i>M. fijiensis</i> por qPCR para diferenciar de los otros miembros del complejo Sigatoka
Canto-Canché <i>et al.</i>	2007	Construcción de una biblioteca de ADN genómico de <i>M. fijiensis</i> usando BAC

Cuadro 11.- Principales estudios moleculares sobre *M. fijiensis* (continuación).

Referencias	Año de publicación	Descripción del estudio
Conde-Ferrández <i>et al.</i>	2007	Aislamiento de los genes <i>mat1-1</i> y <i>mat1-2</i> de <i>M. fijiensis</i> por amplificación de la secuencia homóloga a la caja HMG de <i>M. graminícola</i> .
Joint Genome Institute	2007	Liberación de la versión 1.0 del genoma de <i>M. fijiensis</i> .
Arzanlou <i>et al.</i>	2008	Estudio filogenético de miembros del Complejo Sigatoka y otras especies del género <i>Mycosphaerella</i> usando ITS, genes de Histonas H3 y genes ribosomales
Manzo-Sánchez <i>et al.</i>	2008	Elaboración del primer mapa genético de ligación con 298 marcadores AFLP y 16 SSR
Yang y Zhong	2008	Diseño de 14 microsatélites para <i>M. fijiensis</i>
Zapater <i>et al.</i>	2008	Diseño de microsatélites para la identificación de miembros del Complejo Sigatoka
Cañas-Gutiérrez <i>et al.</i>	2009	Análisis de 6 mutaciones en el gen <i>cyp51</i> y su relación con la resistencia al Propiconazol
García <i>et al.</i>	2010	Desarrollo de 5 marcadores de minisatélites a partir del genoma de <i>M. fijiensis</i>
Joint Genome Institute	2010	Liberación de la versión 2.0 del genoma de <i>M. fijiensis</i> .
Rodríguez-García <i>et al.</i>	2010	Desarrollo de un protocolo para la extracción de ARN total de hojas de banano infectadas con <i>M. fijiensis</i> .
Chuc-Uc <i>et al.</i>	2011	Descripción de componentes del secretoma <i>in vitro</i> de <i>M. fijiensis</i> y sus efectos sobre hojas de <i>Musa sp.</i>
Portal <i>et al.</i>	2011	Construcción de la primera biblioteca sustractiva de la interacción <i>M. fijiensis</i> - <i>Musa acuminata</i> cv. Gran Enano
Couoh-Uicab, <i>et al.</i>	2012	Caracterización del transportador ABC de <i>M. fijiensis</i>
Kantún-Moreno <i>et al.</i>	2012	Caracterización <i>in silico</i> y perfiles de expresión de proteínas GPI durante crecimiento <i>in vitro</i> de <i>M. fijiensis</i> y durante infección de banano
Portal, <i>et al.</i>	2012	Estudios de agresividad en cepa transformada de <i>M. fijiensis</i> con la proteína verde fluorescente

### 1.1.9.- Técnicas usadas para el estudio de expresión de genes

Cómo se pudo apreciar en el cuadro 11, poco es lo que se sabe acerca de la expresión e identidad de los genes que *M. fijiensis* expresa durante la interacción con *Musa sp.* Para ello, se cuenta con una gran variedad de técnicas especializadas en el aislamiento de transcritos provenientes de interacciones entre dos o más organismos, estas se presentan en el cuadro 12.

Como se puede observar en el cuadro 12, existe una gran diversidad de técnicas para el estudio de la expresión diferencial de genes, sin embargo, la Hibridación Substractiva por Supresión (HSS) se destaca por sus múltiples beneficios en el área de la investigación en interacción molecular planta-patógeno, en la siguiente sección se describirá brevemente el principio que rige esta técnica.

#### 1.1.9.1.- Hibridación substractiva por supresión

Esta técnica fue diseñada por Diatchenko *et al.* (1996) y surgió por la necesidad de contar con una estrategia efectiva para determinar aquellos genes que realmente se activan durante la exposición a cierta condición, ya que las técnicas usadas hasta aquel entonces presentaban muchos falsos positivos así como también tenían el inconveniente de requerir una gran cantidad de ADNc.

En la HSS se usa el ADNc de dos muestras, una contiene genes que se han activado debido a la exposición a alguna condición (denominada tester) y la otra tiene los genes provenientes de una población no expuesta (a la que se conoce como driver).

Cada muestra es digerida con la enzima Rsa I con lo cual se obtienen fragmentos de bordes romos, después el tester es dividido en dos partes iguales, a cada una se liga un adaptador diferente (comúnmente denominados A y B); una vez hecho esto, cada porción se hibrida con el driver, esto permite que las secuencias que fueron expresadas diferencialmente permanezcan como cadenas sencillas (paso conocido como sustracción).

Posteriormente se realiza una segunda hibridación mezclando las dos partes y adicionando más driver para enriquecer la fracción de las secuencias expresadas

diferencialmente, se completan los extremos terminales, se adicionan cebadores y se amplifican por PCR. En la figura 4 se presenta un esquema del método.

**Cuadro 12.-** Técnicas aplicadas para la identificación de transcritos expresados diferencialmente.

Técnica	Referencia	Ventajas	Desventajas
SAGE.	Velculescu <i>et al.</i> , 1995.	Ampliamente usado para describir procesos de infección en un amplio rango de organismos.	Muchas etiquetas SAGE no presentan similitud con secuencias reportadas en bases de datos.
Despliegue diferencial.	Welsh <i>et al.</i> , 1992.	Permite determinar qué genes han sido inactivados durante la condición evaluada.	Presencia de falsos positivos.
ADNc-AFLP.	Bachem <i>et al.</i> , 1996.	Permite estudiar una gran cantidad de genes expresados. Es una técnica muy sensible.	La detección de los fragmentos de menor tamaño depende del nivel de sensibilidad y de la cantidad de ADNc usada.
Microarreglos.	Schena <i>et al.</i> , 1995.	En un solo chip caben más de 30, 000 secuencias a probar.	Requiere conocimiento previo de la secuencia.
Hibridación substractiva.	Scott <i>et al.</i> , 1983.	Alta representatividad de transcritos expresados diferencialmente debido a la etapa de cromatografía.	Requiere una gran cantidad de ADNc debido a que en la cromatografía se pierde mucho material.
Hibridación substractiva por supresión.	Diatchenko <i>et al.</i> , 1996.	Permite aislar genes sin conocimiento previo de su secuencia	La obtención de genes depende en gran parte del número de clonas a secuenciar.

### 1.1.9.1.1.- Uso de la hibridación substractiva por supresión en el estudio de la interacción planta-patógeno

La HSS ha sido ampliamente usada en el estudio de la interacción planta-patógeno permitiendo hacer estudios comparativos entre transcriptomas de cepas diferentes del mismo patógeno (Alavi *et al.*, 2008), búsqueda de genes de resistencia de variedades silvestres (Bogacki *et al.*, 2008) así como también búsqueda de genes involucrados en el desarrollo, formación de estructuras infectivas y genes de patogenicidad, los cuáles se describen a continuación.

#### a).-Genes relacionados con el desarrollo del patógeno.

En algunas especies de hongos patógenos se ha observado que el proceso de desarrollo está íntimamente relacionado con la infección en el hospedero, Andrews *et al.* (2004), estudiaron los genes involucrados en la transición de *Ustilago maydis* de su fase de levadura a su fase miceliar. Los autores encontraron que en este proceso están involucrados genes que codifican proteínas relacionadas con procesos metabólicos (Succinato deshidrogenasa), transportadores (Transportadores de alantoína) así como proteínas estructurales (Actina).

#### b).-Genes que codifican proteínas involucradas en el proceso de infección.

Zhang *et al.* (2011) encontraron que durante el proceso de infección temprana de *Metarhizium anisoplae* sobre *Locusta migratoria*, el hongo transcribe una gran variedad de genes relacionados con diversos procesos como: metabolismo celular, transducción de señales, transporte celular, respuesta ante estrés detoxificación y metabolismo secundario. Éste último proceso es muy importante ya que como señalan los autores muchos hongos producen durante los procesos de infección diversas toxinas gracias a la acción de enzimas como las Policétido sintasas, Epóxido hidrolasas, entre otras. Otro aspecto que observaron fue el hecho de que genes relacionados con la síntesis de proteínas quelantes de iones Fe tenían una expresión importante durante el proceso de infección; estas proteínas secuestran el Fe presente en el medio el cual es necesario para la síntesis de proteínas de defensa.

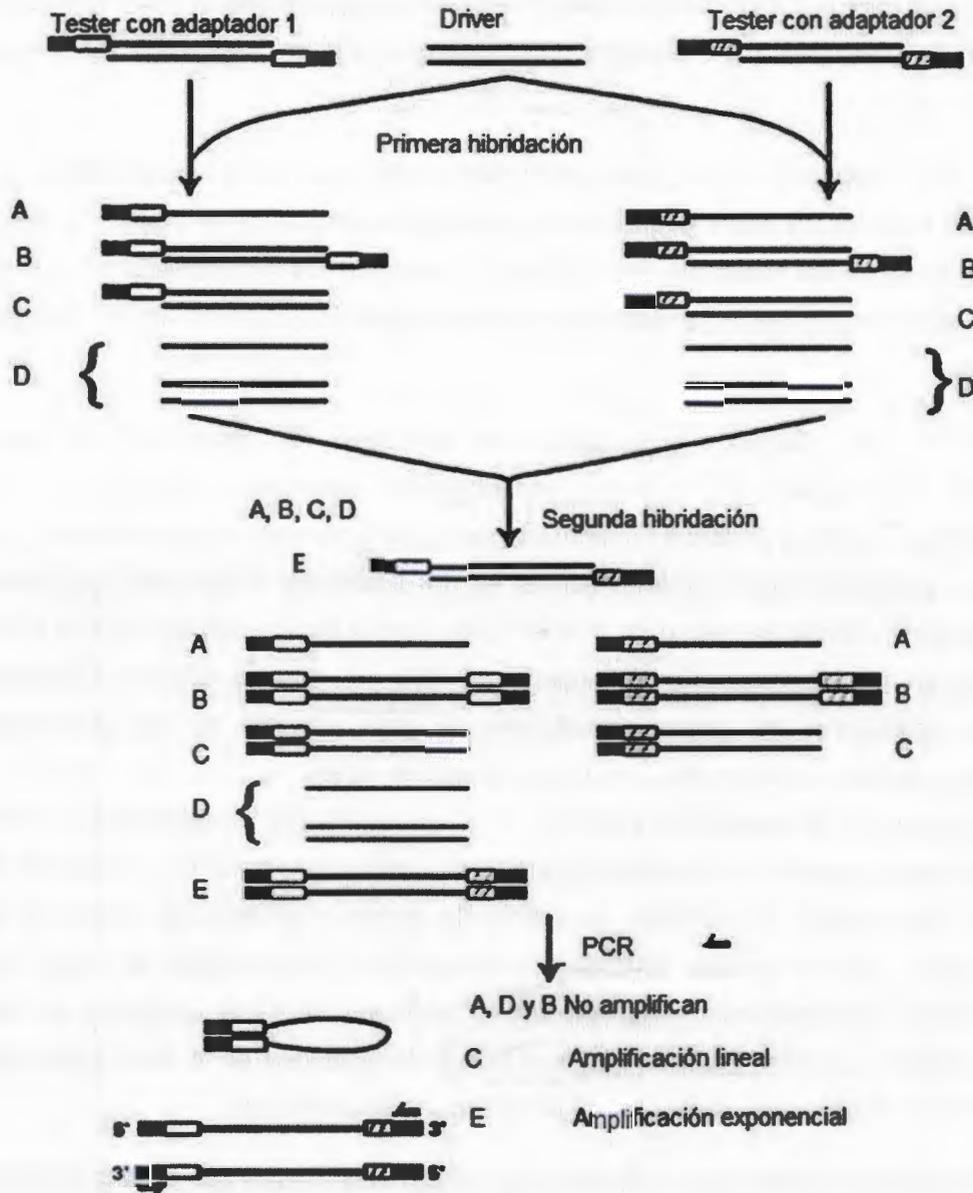


Figura 4.- Esquema representativo de la hibridación substractiva por supresión (Adaptado de Diatchenko *et al.*, 1996).

#### **1.1.9.1.1.1.- Uso de la Hibridación substractiva por supresión (HSS) para el estudio de genes que se expresan durante interacciones planta patógeno en etapas tempranas**

La HSS tiene una gran aceptación dentro del campo de fitopatología por proporcionar información sobre aquellos genes que se expresan diferencialmente, sobre todo en sistemas en los cuales se desconocen los mecanismos moleculares que se dan durante estas interacciones y que además no se tiene disponible genoma alguno (Bogacki *et al.*, 2008).

En el 2008, Bogacki y colaboradores estudiaron la interacción temprana incompatible de la cebada con el hongo hemibiotrófico *Pyrenophora teres* en sus dos formas *P. teres f. teres* y *P. teres f. maculata*; para ello construyeron una biblioteca por hibridación substractiva por supresión con el fin de determinar cuáles eran los genes expresados por la planta en respuesta a la infección, con la cual generaron de 335 a 367 clonas con un tamaño promedio del inserto de 222 pb, aunque algunas contenían transcritos codificantes de genes constitutivos, la gran mayoría de las secuencias codificaban proteínas relacionadas con los procesos de infección, lo que se confirmó al tener un porcentaje de sustracción de 62%. Entre los principales procesos de la planta que se activaron durante la interacción fueron: metabolismo secundario, transporte de moléculas, transducción de señales, expresión de genes, y síntesis de proteínas de defensa. Estos autores también encontraron secuencias pertenecientes al hongo, sin embargo, éstas no presentaron homología contra las bases de datos utilizadas aún con un valor de corte bajo ( $E=1*10^{-5}$ ), lo cual nos puede dar una idea de lo mucho que falta por explorar en los primeros momentos de la interacción planta-hongo.

En *Nicotiana megalosiphon*, Borrás *et al.* (2007) encontraron que ante la infección de *Peronospora hyoscyami f. sp. tabacina*, se expresaban genes que codificaban para la síntesis de una Proteína transportadora de lípidos, para un factor de respuesta a etileno y para la Glutación sintetasa, los cuales no se expresaban en cultivares susceptibles.

En el patosistema *Musa acuminata-Mycosphaerella fijiensis* la HSS se ha utilizado en 3 ocasiones con diferentes resultados, Dagert *et al.* (2002) realizaron una biblioteca a partir de la interacción de *M. fijiensis* con el cultivar resistente Yangambi Km5 cultivado en condiciones *in vitro* el cual fue inoculado con una suspensión conidial, este

trabajo abarcó las primeras 72 h de interacción en las cuales se confirmó la expresión de una  $\beta$ -1,3-glucanasa como parte del sistema de defensa.

Mendoza-Rodríguez *et al.* (2006) construyeron una biblioteca de interacción de plántulas obtenidas por cultivo *in vitro* del cultivar resistente Calcuta IV las cuales fueron inoculadas con una suspensión micelial *M. fijiensis*. El material se recolectó dentro de los primeros 12 días posteriores al establecimiento del experimento. En este trabajo el tester consistió en el ADNc generado de plántulas inoculadas y el driver estuvo compuesto por cantidades iguales de ADNc de plántulas control (sin inocular) y ADNc de micelio del hongo. El tamaño de los fragmentos osciló entre 300 y 700 pb, se secuenciaron 69 clonas cuyas secuencias fueron comparadas con la base de datos BLAST con una matriz BLOSUM 62 y un valor de  $E=1*10^{-4}$ ; como resultado, se obtuvo que el 13% de las secuencias blanco presentó homología con Metalotioninas, estas proteínas están relacionadas con procesos de detoxificación y mantenimiento de la homeostasis celular,

Mendoza-Rodríguez *et al.* (2008) obtuvieron las secuencias de 192 clonas del trabajo de Mendoza-Rodríguez *et al.* (2006) para realizar una búsqueda más amplia de los genes sustraídos usando la herramienta BLASTx con un valor de E de  $1*10^{-10}$ . Del total de clonas sólo se obtuvieron 98 secuencias las cuales oscilaban entre 100 y 1,350 pb, de éstas se ensamblaron 63 secuencias que produjeron 21 contigs (ensamblajes). Al analizar las secuencias con las bases de datos mencionadas se encontró que codificaban proteínas relacionadas con procesos como: estrés oxidativo (4.8%), tráfico de proteínas (1.6%), metabolismo (6.3%) y producción de energía (6.3%); la mayor parte de las secuencias no presentaron una función conocida (38.1%) ni presentaron homología (42.8%), lo cual pudiera deberse a que las secuencias comparten regiones muy pequeñas con homología a alguna entrada de la base de datos o que un marco de lectura incompleto pudiera interferir con el alineamiento de las secuencias de tal manera que no pudieran superar el valor de corte E.

Portal *et al.* (2011), al analizar las secuencias de una biblioteca de la interacción de *M. fijiensis* y plántulas de *Musa acuminata* cv. Gran Enano con síntomas de etapas intermedia y tardía [estados 3 y 4 de la escala de Fouré (1985)] encontraron secuencias relacionadas con proteínas de defensa principalmente de la ruta del ácido jasmónico y algunas enzimas para el caso del hospedero, y para el patógeno obtuvieron la secuencia

de la enzima UDP-Glucosa pirofosforilasa, de la cual se piensa está relacionada con el metabolismo de trehalosa, un osmoprotector en las etapas intermedias de la infección.

En cuanto a los resultados de Portal *et al.* (2011) se puede inferir que la obtención de una sola secuencia del patógeno pudo deberse a que sólo se secuenciaron 130 clonas. Con respecto a este tema, Bower *et al.* (2005) especifica que uno de los factores más importantes para obtener secuencias representativas es la selección del número de clonas ya que la probabilidad de obtener una secuencia de interés aumenta a medida que se incrementa el número de muestras a secuenciar. Otro factor que determina el éxito del estudio es la proporción de la secuencia de interés con respecto a otras presentes en la muestra a clonar.

Bower *et al.* (2005) realizaron modelos matemáticos en los cuáles se afirmaron que, hasta con un nivel de confianza de 75%, se podría obtener una secuencia cuya proporción con respecto a otras 3 de la misma longitud fuera mayor a 60% y que, según sus estimaciones, para obtener una secuencia representativa era necesario procesar al menos 20 muestras o 3-5% el total de clonas obtenidas; en transcriptomas de interacción la gran proporción de material vegetal con respecto al fúngico contribuye a la poca representación de estos últimos. Adicionalmente, los autores afirman que sus resultados reflejan secuencias altamente representadas lo cual indicaría que la probabilidad de encontrar secuencias de transcritos de baja expresión disminuye.

#### **1.1.10.- Técnicas de secuenciación**

##### **1.1.10.1.- Secuenciación clásica**

Sanger *et al.* (1977) desarrollaron la técnica de secuenciación de ADN más usada llamada secuenciación dideoxi. Los requisitos para este método son los siguientes: ADN a secuenciar, un cebador complementario a una secuencia corta del ADN, ADN polimerasa, deoxinucleótidos y dideoxinucleótidos, éstos últimos carecen de su grupo 3' hidroxilo (en lugar de ello tienen un átomo de hidrógeno), lo cual impide que la reacción de síntesis de la cadena de ADN continúe.

Originalmente se necesitaban cuatro reacciones independientes, a cada una se le agregaba un dideoxinucleótido en específico, así se podía distinguir la adición de cada

dideoxinucleótido en los nuevos fragmentos de ADN debido a que estaban marcados con radioisótopos. Los productos de las reacciones eran cargados en un gel desnaturalizante de acrilamida y separados por electroforesis a una resolución tal que permitiera distinguir entre cadenas con tan sólo un nucleótido de diferencia. Después de procesar el gel los resultados se leían de abajo hacia arriba, permitiendo así descubrir la secuencia del fragmento de ADN analizado (Krebs *et al.*, 2011; Sanger *et al.*, 1977).

Para mejorar la eficiencia del método se han introducido dos mejoras al proceso de secuenciación, la primera es la marcación de los nucleótidos con etiquetas fluorescentes distintas, de tal manera que ya no es necesario realizar 4 reacciones distintas ya que la marcación diferencial permite distinguir entre nucleótidos en el mismo producto de reacción. La segunda modificación consiste en el cambio de los geles de acrilamida grandes por tubos capilares de vidrio con geles del mismo polímero, éstos tubos permiten disipar el calor con mayor rapidez lo que permite aumentar el voltaje aplicado, reduciendo con ello el tiempo requerido para la separación (Krebs *et al.*, 2011).

#### **1.1.10.2.- Secuenciación masiva**

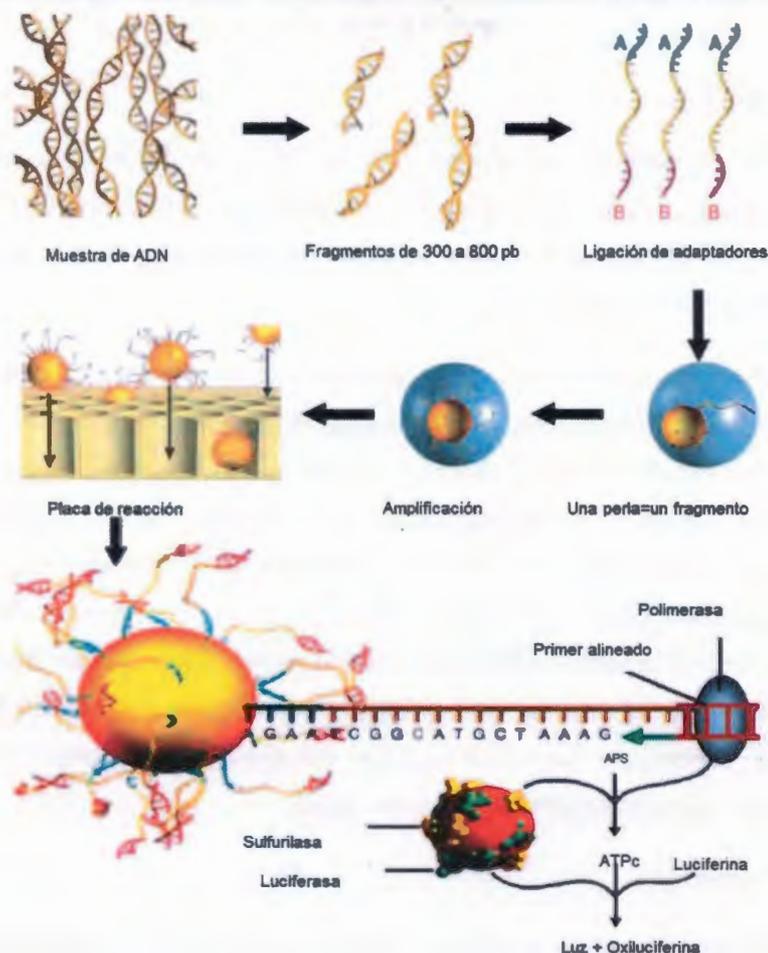
La necesidad de optimizar tiempos y recurso humano así como también de generar una mayor cantidad de datos, condujo al desarrollo de métodos de secuenciación masiva, estos sistemas eliminan la necesidad de la separación de los fragmentos a través de un gel que era uno de los factores que más consumía tiempo en la secuenciación clásica (Krebs *et al.*, 2011).

Algunos de los métodos de secuenciación masiva existentes en el mercado son el Illumina, SOLiD, Helicos y el 454, los cuales varían en los principios usados, la longitud de fragmentos entregados, entre otros factores. El sistema 454 se ha destacado de entre los otros gracias a la gran cantidad de datos generados (100, 000 secuencias/h) y a la longitud de los mismos (400 pb), lo que es muy útil cuando se desea saber la identidad de genomas o transcriptomas de los cuales se sabe poco o nada, a este proceso se le conoce como secuenciación *de novo*, ya que no se tiene información de referencia contra la cual contrastar cuando se requiere hacer el ensamblaje de los productos de secuenciación (Su *et al.*, 2011).

En el 2005, la compañía 454 Life Sciences (ahora parte de Roche Applied Science) desarrolló y comercializó su propio sistema de secuenciación para análisis masivos, el cual significó un gran avance para el desarrollo de proyectos de secuenciación de genomas y transcriptomas, además de que redujo el costo y el tiempo consumido de los mismo (la secuenciación del genoma humano tomó 13 años y 2.7 mil millones de dólares con la secuenciación clásica y 5 meses y 1.5 millones de dólares con el sistema 454) (Wheeler *et al.*, 2008; Margulies *et al.*, 2005).

Este sistema se basa en los principios de la detección de pirofosfato y la PCR en emulsión, donde los fragmentos de ADN son ligados a adaptadores de secuencia conocida los cuales son enlazados a una perla, cada perla es capturada por separado en una emulsión donde se llevará a cabo la reacción de amplificación, produciéndose 10 millones de copias de la muestra de ADN que son suficientes para generar la señal de luz que se registrará en el lector (Fuller *et al.*, 2009).

Al término de la amplificación se rompe la emulsión y las perlas que contienen los fragmentos de ADN amplificados son enriquecidas para después ser separadas y colocadas en una placa con pozos cuyo volumen es de picolitros. Durante cada ciclo de pirosecuenciación, una sola especie de nucleótido sin etiquetar es añadida a la mezcla de reacción en todos los pozos de la placa de manera que permita (dependiendo de si es o no complementaria a la secuencia de ADN) la elongación de la hebra de ADN complementaria (Margulies *et al.*, 2005). Con la incorporación de cada base a la cadena se produce pirofosfato como producto de la reacción el cual es convertido en ATP por la enzima sulfurilasa, después este es hidrolizado por la enzima luciferasa para oxidar luciferina a oxiluciferina y con ello generar un impulso de luz el cual es captado por el sistema a través de dispositivos de imagen de carga acoplada enlazadas a un haz de fibra óptica (Su *et al.*, 2011; Ronaghi *et al.*, 1996). En la figura 5 se presenta una esquematización del proceso.



**Figura 5.-** Esquema del proceso de secuenciación por el sistema 454 (Adaptado de Su *et al.*, 2011).

Uno de los errores de este sistema es que debido a la falta de motivos terminadores que prevengan múltiples incorporaciones consecutivas en un ciclo de reacciones de pirosecuenciación, la longitud de homopolímeros debe ser inferida a partir de la intensidad de la señal luminosa, aumentando ésta conforme aumentan las repeticiones. La tasa de errores de repeticiones consecutivas aumenta cuando éstas son mayores a 3-4 bases repetidas (Shendure y Ji, 2008), esta característica del sistema era un problema para la secuenciación de transcriptomas (abundantes colas de Poli A), sin embargo, Prentis *et al.* (2010) introdujeron el uso de la enzima de restricción Mme I la cual tiene la capacidad de remover las colas de Poli A de los ADNc generados, por lo que a partir de su trabajo la secuenciación de transcriptomas por este sistema se ha puesto al alcance de una mayor cantidad de proyectos.

## **1.2.- JUSTIFICACIÓN**

Actualmente se cuenta con mucha información a nivel macro y microscópico acerca de las diversas etapas de la infección en *Musa acuminata* por *Mycosphaerella fijiensis*, sin embargo, se necesitan realizar estudios moleculares que permitan un mayor entendimiento del proceso de infección.

Para ello se han realizado algunos trabajos en etapas intermedias o tardías sobre la síntesis de transcritos que permiten al hongo establecerse y colonizar a su hospedero, estos trabajos han usado la secuenciación clásica como método para obtener los transcritos que se expresan diferencialmente. Sin embargo, estos trabajos no han aportado información abundante sobre estos mecanismos por lo que es necesario buscar estrategias que permitan lograr este objetivo, el cual se puede lograr combinando dos técnicas masivas de alto impacto como son la Hibridación Sustractiva por Supresión y la Secuenciación masiva por el sistema Roche/454, la posterior identificación de las posibles funciones de las secuencias permitirá realizar estudios para diseñar en el futuro programas de control efectivos contra la Sigatoka negra.

## **1.3.- OBJETIVO GENERAL**

Aislar transcritos fúngicos generados durante la interacción temprana de *Musa acuminata* cv. Gran Enano y *Mycosphaerella fijiensis*.

### **1.3.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Reproducir la infección de *M. fijiensis* en fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran Enano.
- Generar una biblioteca de ADNc por la técnica hibridación substractiva por supresión realizando las modificaciones pertinentes para su secuenciación masiva por el sistema 454

## **1.4.- ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

El proyecto se dividió en dos etapas las cuales se describen brevemente a continuación y se resumen en la figura 6:

**1.4.1.- Etapa 1.-Interacción *in vitro*.** Para reproducir la infección *in vitro* primeramente se procedió a crecer a *M. fijiensis* cepa C1233 para posteriormente inducir la producción

esporas asexuales (conidios) en un medio específico para ese fin de acuerdo al protocolo reportado por Peraza-Echeverría *et al.* (2008); cabe aclarar que debido a que en el presente trabajo se utilizó la forma asexual del hongo, el nombre correcto debe de ser *P. fijiensis*, sin embargo, en concordancia a la literatura expuesta anteriormente se utilizará el nombre de *M. fijiensis*.

A la par de estas actividades se inició el establecimiento de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran enano en medio Agar Bencimidazol, según el protocolo de El-Hadrami (2000) modificado por el grupo de la Dra. Rodríguez-García. Una vez obtenidos los conidios se infectaron fragmentos foliares y se cultivaron junto a fragmentos foliares no infectados en un cuarto acondicionado bajo fotoperiodo.

**1.4.2.- Etapa 2.-Generación de la biblioteca de ADNC por Hibridación substractiva por supresión** Se extrajo el ARN total de los fragmentos foliares infectados (tester), de fragmentos foliares control y de conidios y micelio de *M. fijiensis* (los cuales constituyen el driver), a partir del cual se sintetizó el correspondiente ADNc con los iniciadores de Prentis *et al.* (2010). Posteriormente se construyó la biblioteca de ADNc por HSS utilizando el kit de Clontech diseñado para ese propósito.



**1.5.- BIBLIOGRAFÍA**

- Abiala, M. A., A. A. Ogunjobi, A. C. Odebode y M. A. Ayodele (2011). Evaluation of plant extracts as an antagonist to mycelial growth of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Archives of Phytopathology and plant protection. 44(17), 1711-1718.
- Alavi, S. M., S. Sanjari, F. Durand, C. Brin, C. Manceau y S. Poussier (2008). Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. phaseoli and *Xanthomonas fuscans* subsp. fuscans as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. Applied and Environmental Microbiology. 74(10), 3295-3301.
- Álvarez, J. M. y A. Beltrán (2003). Tecnología de producción con altas densidades en bananos y plátanos en Cuba y avances hacia una producción orgánica. In: Rivas G, Rosales F (Eds.) Taller Manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas en los trópicos. MUSALAC, INIBAP. Guayaquil, Ecuador. pp. 65-66.
- Andrews, D. L., M. D. García-Pedrajas y S. E. Gold (2004). Fungal dimorphism regulated gene expression in *Ustilago maydis*: I. Filament up-regulated genes. Molecular Plant Pathology. 5(4), 281-293.
- Arias, P., C. Dankers, P. Liu y P. Pikauskas (2003). The world banana economy, 1985-2002. Rome. Food and Agriculture Organization.
- Arvanitoyannis, I. S., A. G. Mavromatis, G. Grammatikati-Avgeli y M. Sakellariou (2008). Banan: cultivars, biotechnological approaches and genetic transformation. International Journal of food science and technology. 43, 1871-1879.
- Arzanlou, M., E. C. A. Abeln, G. H. J. Kema, C. Waalwijk, J. Carlier, I. de Vries, M. Guzmán y P. W. Crous (2007) Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. Phytopathology. 97(9), 1112-1118.
- Arzanlou, M., J. Z. Groenewald, R. A. Fullerton, E. C. A. Abeln, J. Carlier, M.-F. Zapater, I. W. Buddenhagen, A. Viljoen, P. W. Crous (2008). Multiple gene genealogies and

phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*. 20, 19-37.

Arzate-Vega, J., A. C. Michel-Aceves, V. M. Domínguez-Márquez y O. A. Santos-Eméstica (2006). Antagonismo de *Trichoderma spp.* sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del plátano (*Musa sp.*) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24(002), 98-104.

Bachem, C. W., Van Der Hoeven, R. S., De Bruijn, S. M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M. and Visser, R. G. (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*, 9, 745-753.

Balint-Kurti, P. J., G. D. May y A. C. L. Churchill (2001). Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiology Letters*. 195, 9-15.

Barhoom, S. y A. Sharon (2004). cAMP regulation of "pathogenic" and "saprophytic" fungal spore germination. *Fungal Genet Biol.* 41, 317-326.

Belalcázar, C. S, F. E. Rosales y M. J. Espinosa (2003). Altas densidades de siembra en plátano, una alternativa rentable y sostenible de producción. In: Rivas G, Rosales F (Eds.) Taller Manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas en los trópicos. MUSALAC, INIBAP. Guayaquil, Ecuador. pp. 55-63.

Bogacki, P., K. H. Oldach and K. J. Williams, (2008). Expression profiling and mapping of defence response genes associated with the barley-*Pyrenophora teres* incompatible interaction. *Molecular Plant Pathology*. 9(5), 645-660.

Borrás, O., O. Chacón, R. Partieles, C. Collazo, Y. López, C. J. Barroto, C. Ayra, M. Pujol, R. Rodríguez, M. Sunchís, M. Simón, O. Oliva, J. A. Crespo, H. García y V. Andino (2007). Identification of new disease resistance genes in tobacco via functional genomics. *Biotecnología aplicada*. 24(1), 76-78.

- Bower, M. A., M. Spencer, S. Matsumura, R. E. R. Nisbet y C. J. Howe (2005). How many clones need to be sequenced from a single forensic or ancient DNA sample in order to determine a reliable consensus sequence? *Nucleic Acids Research*. 33(8), 2549-2556.
- Calderón, H. y R. Arango (2004). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la inducción de enzimas de defensa, ROS y fenólicos en un modelo susceptible y resistente de plantas de *Musa* en condiciones controladas de infección y en campo. Trabajo de posgrado. Maestría en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Canto-Canché, B., D. K. Guillén-Maldonado, L. Peraza-Echeverría, L. Conde-Ferrández y A. James-Kay (2007). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of the causal agent of Black Sigatoka fungal leaf spot disease of banana and plantain, *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol. Biotechnol.* 36, 64-70.
- Cañarte, S. (2003). Control de plagas en banano por la vía de la nutrición, Memorias del Taller Internacional para el Manejo Integrado de Sigatoka Negra y Otras Plagas en *Musa*. MUSALAC/INIBAP, Guayaquil, Ecuador.
- Cañas-Gutiérrez, G. P., L. F. Patiño, E. Rodríguez-Arango y R. Arango (2006). Molecular characterization of Benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *J. Phytopathology*. 154, 403-409.
- Cañas-Gutiérrez, G. P., M. J. Angarita-Velásquez, J. M. Restrepo-Flórez, P. Rodríguez, C. X. Moreno y R. Arango (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Manag Sci.* 65, 892-899.
- Carlier, J., M.-F. Zapater, F. Lapeyre, D. R. Jones y X. Mourichon (2000). Septoria leaf spot of banana: A newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (Anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology*. 90(8), 884-890.

- Carver T. L. W., H. Kunoh, B. J. Thomas, R. L. Nicholson (1999). Release and visualization of the extracellular matrix of conidia of *Blumeria graminis*. *Mycol Res* 103, 546–560.
- Cavalcante, María de Jesús B., J. Escoute, J. P. Madeira, R. E. Romero, M. R. Nicole, L. C. Oliveira, C. Hamelin, M. Lartaud y J. L. Verdeil (2011). Reactive oxygen species and cellular interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and banana. *Tropical Plant Biol.* 4(2), 134-143.
- Ceballos, I., S. Mosquera, M. Angulo, J. J. Mira, L. E. Argel, D. Uribe-Velez, M. Romero-Tabarez, S. Orduz-Peralta y V. Villegas (2012). Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microb. Ecol.* 64, 641-653.
- Chen, Z., M. A. Nunes, M. C. Silva y C. J. Rodrigues (2004). Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration. *Mycologia.* 96, 1199–1208.
- Conde-Ferrález, L., C. Waalwijk, B. Canto-Canché, G. H. J. Kema, P. W. Crous, A. C. James y E. C. A. Abeln (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.* 8(1), 111-120.
- Chica, R., M. Herrera, I. Jiménez, S. Lizcano, J. A. Montoya, L. F. Patiño, P. A. Rodríguez y L. H. Ruíz (2004). Impacto y manejo de la Sigatoka negra en el cultivo de banano de exportación en Colombia. XVI Reunión internacional ACORBAT, pp. 53-62.
- Chuc-Uc, J., L. Brito-Argáez, B. Canto-Canché, M. Tzec-Simá, C. Rodríguez-García, L. Peraza-Echeverría, S. Peraza-Echeverría, A. James-Kay, C. A. Cruz-Cruz, L. M. Peña-Rodríguez e I. Islas-Flores (2011). The *in vitro* secretome of *Mycosphaerella fijiensis* induces cell death in banana leaves. *Plant Physiology and Biochemistry.* 49, 572-578.
- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the Black Leaf Streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection,

- development and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*. 12(4), 307-328.
- Couoh-Uicab, Y., I. Islas-Flores, N. Kantún-Moreno, L.-H. Zwiars, M. Tzec-Simá, S. Peraza-Echeverría, L. Brito-Argáez, L. Peraza-Echeverría, R. Grijalva-Arango, A. James, C. Rodríguez-García y B. Canto-Canché (2012). Clonin, *in silico* structural characterization and expression analysis of *MfAtr4*, an ABC transporter from the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *African Journal of Biotechnology* 11(1), 54-79.
- Cronshaw, K. y A. Akers (1990). Mode of Action of Tridemorph and Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Sigatoka Leaf Spot Diseases of Bananas*. Proc. Int. Workshop, March 28-April 1, 1989, INIBAP, Montpellier, France.
- Crous, P. W. (1998). *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of Eucalyptus. *Mycologia Memoir* 21, 1–170.
- Crous, P. W., B. A. Summerell, A. J. Carnegie, M. J. Wingfield, G. C. Hunter, T. I. Burgess, V. Andjic, P. A. Barber y J. Z. Groenewald (2009). Unraveling *Mycosphaerella*: do you believe in genera? *Persoonia*. 23, 99-118.
- Crous, P. W., K. Tanaka, B. A. Summerell y J. Z. Groenewald (2011). Additions to the *Mycosphaerella* complex. *IMA Fungus*. 2(1), 49-64.
- Crous, P. W., L. Hong, M. J. Wingfield, B. D. Wingfield y J. Kang (1999). *Uwebraunia* and *Dissoconium*, two morphologically similar anamorph genera with distinct teleomorph affinity. *Sydowia* 52, 155 –166.
- Crous, P. W., U. Braun y J. Z. Groenewald (2007). *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in mycology*. 58, 1-32.
- Crous, P. W. y X. Mourichon (2002). *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. nov: causal agent of eumusae leaf spot disease in banana. *Sydowia*. 54, 35-43.

- Dagert, M., K. Boscán, A. Briceño y S. Rangel (2002). Búsqueda de genes de defensa contra la Sigatoka negra en musáceas, in: Acobat. Memorias XV reunión. Asociación de bananeros de Colombia. Pp. 54-58.
- Daniells, J., C. Jenny, D. Karamura y K. Tomekpe (2001). Musalogue: a catalogue of Musa germplasm, in: Diversity in the Genus Musa, Arnaud y S. Sharrock (ed). International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier. pp. 75-80.
- Dean, R. A. (1997). Signal pathways and appressorium morphogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 35, 211-234.
- Dean, R.A., Y.-H. Lee, T. K. Mitchell y D. S.Whitehead (1994). Signalling systems and gene expression regulating appressorium formation in *Magnaporthe grisea* in Rice Blast Disease. R. S. Zeigler, S. A. Leong y P. S. Teng. Cambridge Univ Press. pp. 23-24.
- Deising H. y K. Mendgen (1992) Developmental control of enzyme production and cell wall modification in rust fungi, and defence reactions of the host plant. In: Stahl U, Tudzynski P (eds) Molecular biology of filamentous fungi. VCH,Weinheim, pp 27-44
- Deising, H., A. K. Frittrang, S. Kunz y K. Mendgen (1995). Regulation of pectin methylesterase and polygalacturonate lyase activity during differentiation of infection structures in *Uromyces vicia fabae*. Microbiology. 141, 561-571.
- deJong, J. C., B. J. McCormack, N. Smirnoff y N. J. Talbot (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. Nature. 389, 244-245.
- de Langue, E., E. Hribová, S. Carpentier, J. Dolezel y R. Swennen (2010). Did backcrossing contribute to the origin of hybrid edible bananas? Annals of botany. 106, 849-857.
- de Langue, E. L. Vrydaghs, P. de Maret, X. Perrier y T. Denham (2009). Why bananas matter: an introduction to the history of banana domestication. Ethnobotany research and applications. 7, 165-177.

- Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov and P. D. Siebert (1996). Suppression Subtractive Hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. PNAS. 96(12). 6025-6030.
- Doehleman, G., P. Berndt y M. Hahn (2006). Different signaling pathways involving a G  $\alpha$  protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. Mol Microbiol. 59, 821-835.
- Epstein, L. Y. H. Kwon, D. E. Almond, L. M. Schached y M. J. Jones (1994). Genetic and biochemical characterization of *Nectria haematococca* strains with a adhesive and a adhesion-reduced macroconidia. Appl. Environ. Microbiol. 60, 524-530.
- Essenberg, M. (2001). Prospects for strengthening plant defenses through phytoalexin engineering. Physiol and Mol Plant Pathol 59, 71 –81.
- Flaishman, M. A. y P. E. Kolattukudy (1994). Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 6579-6583.
- Fonsah, E. G. y A. S. N. D. Chidebelu (2011). Economics of banana production and marketing in the tropics. A case study of Camerron. Langha RPCIG press, Camerún. 262 p.
- Food and Agriculture Organization (2011). FAOSTAT. [Online] Disponible en: <http://faostat.fao.org>. [Acceso el 01 de Abril del 2013].
- Fortunato, A. A., F. A. Rodrigues, J. C. Parpaiola-Baroni, G. C. Barbosa-Soares, M. A. Dita-Rodriguez y O. Liparini-Pereira (2012). Silicon suppresses Fusarium wilt development in banana plants. J. Phytopathol. 160(11-12), 674-679.
- Foster, A. J., J. M. Jenkinson y N. J. Talbot (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. EMBO J. 22, 225-235.

- Fouré, E. (1985). Black Leaf Streak disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the diseases in Gabon. IRFA. Paris, France. 23 p.
- Fouré, E. y A. Moreua (1992). Contribution á L'étude épidémiologique de la cercosporiose noide dans la zone bananière du Moungo au cameroum de 1987 á 1989. Fruits. 1, 3-16.
- Fuller, C. W., L. R. Middendorf, S. A. Benner, G. M. Church, T. Harris, X. Huang, S. B. Jovanovich, J. R. Nelson, J. A. Schloss y D. C. Schwartz (2009). The challenges of sequencing by synthesis. Nat.Biotechnol. 22(11), 1013–1023.
- García, S. A. L., T. A. J. Van der Lee, C. F. Ferreira, B. T. L. Hekkert, M.-F. Zapater, S. B. Goodwin, M. Guzmán, G. H. J. Kema y M. T. Souza Jr. (2010). Variable number of tandem repeat markers in the genome of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana (*Musa spp.*). Genetics and Molecular Research. 9(4), 2207-2212.
- Gauhl, F. (1994) Epidemiology and ecology of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) on plantain and banana (*Musa spp.*) in Costa Rica, Central America. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France.
- Gevens, A. J., T. L. W. Carver, B. J. Thomas y R. L. Nicholson (2001). Visualization and partial characterization of the ECM of *Pestalotia malicola* on artificial and natural substrata. Physiol Mol Plant Pathol. 58, 277–285.
- González R., J. Bocanegra, C. Osorio y J. Valladares (2000). Effect of Siganax (Pyrimethanil) 60 SC in the Control of Black Sigatoka. Proceedings of the XIV ACORBAT Meeting, San Juan, Puerto Rico Jul. 31-Aug. 4., p. 69.
- Goodwin, S. B., L. D. Dunkle y V. L. Zismann (2001). Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the Internal Transcribed Spacer region of ribosomal DNA. Phytopathology. 91(7), 648-658.
- Görlach, J., S. Volrath, G. Knauf-Beiter, U. Beckhove, K. H. Kogel, M. Oostendorp, T. Staub, E. Ward, H. Kessmann y J. Ryals (1996). Benzothiadiazole a novel class of

chemical inducers of Systemic Acquired Resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*. 8, 629-643.

Guzmán, M. y R. Romero (1995) Determinación del efecto antiesporulante de diferentes compuestos sobre *Mycosphaerella fijiensis*. p. 46. In: Informe anual 1994. Departamento de Investigación y Diversificación Agrícola CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR). San José, Costa Rica.

Hardham, A. R. (2007). Cell biology of fungal and oomycete infection of plants, in: *Biology of the fungal cell*, 2nd. Edition, Howard, R. J. (ed). Springer-Verlag Press. Berlin. pp. 251-289.

Hernández, Y., F. Portillo, M. Portillo, C. Navarro, M. Rodríguez y J. Velazco (2006). Densidad estomática en materiales de plátano (*Musa* AAB, AAAB y ABB) susceptibles y resistentes a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 23, 292-297.

Hidalgo, M., A. Tapia, W. Rodríguez y E. Serrano (2006). Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). *Agronomía costarricense*. 30(001), 35-41.

Hörbach, R., A. R. Navarro-Quesada, W. Knogge y H. B. Deising (2011). When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology*. 168, 51-62.

Hoss, R., J. Helbig y H. Bochow (2000). Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the Black Sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopathology*, 148 (7-8), 387-394.

Howard, R. J., M. A. Ferrari, D. H. Roach y N. P. Money (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88, 11281-11284.

Howard, R. J. y B. Valent (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 491- 512.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2010). El sector alimentario en México 2010. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México. 302 p.
- International Mycological Association, 2012. *Pseudocercospora fijiensis* classification. [Online] (Actualizado 06 de Julio del 2012) Disponible en: <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr =32157> 6. [Acceso 29 de Octubre del 2012.]
- Islas-Flores, I., L. Peraza-Echeverría, B. Canto-Canché y C. M. Rodríguez-García (2006). Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular Biotechnology*. 34, 45-50.
- Jacques, D. F. y B. Kuhlman (1999). Exxon/Esso Experience with Horticultural MineralOils. Sprays Oils Beyond 2000, oct. 25-29, Sydney, Australia.
- Jiménez, J. M., J. J. Galindo y C. Ramírez (1987). Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. Diiformis mediante bacterias epífitas. Memorias de la VII Reunión Intemacional de ACORBAT, Costa Rica. pp. 105-109.
- Joint Genome Institute (2007). *Mycosphaerella fijiensis* Genome V. 1.0. [Online] Disponible en <http://genomeportal.jgi-psf.org/Mycfi1/Mycfi1.home.html>. [Acceso 01 de Mayo del 2013]
- Joint Genome Institute (2008). *Mycosphaerella fijiensis* Genome V. 2.0 [Online] Disponible en: <http://genome.jgi-psf.org/Mycfi2/Mycfi2.home.html> [Acceso 16 de Octubre del 2012].
- Jones, D. R. (2000) Diseases of Banana, Abacá and Enset. CABI Publishing. 544 pp.
- Jones, M. J. y L. Epstein (1989). Adhesion of *Nectria haematococca* macroconidia. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 35, 453-461.
- Kantún-Moreno, N., R. Vázquez-Euan, M. Tzec-Simá, L. Peraza-Echeverría, R. Grijalva-Arango, C. Rodríguez-García, A. C. James-Kay, J. H. Ramírez-Prado, I. Islas-Flores, B. Canto-Canché (2012). Genome-wide in silico identification of GPI

- proteins in *Mycosphaerella fijiensis* and transcriptional analysis of two GPI-anchored  $\beta$ -1,3-glucanotransferases. *Mycologia*. 12(103).
- Kaars-Sijpesteijn, A., H. M. Dekuijzen y J. W. Vonk (1977). Biological conversions of fungicides in plants and microorganisms. *Antifungal Compounds*. 2, 149-208.
- Kinane, J., S. Dalvin, L. Bindslev, A. Hall, S. Gurr y R. Oliver (2000). Evidence that the cAMP pathway controls emergence of both primary and appressorial germ tubes of barley powdery mildew. *Mol Plant Microbe Interact*. 13, 494–502.
- Krebs, J. E., E. S. Goldstein y S. T. Kilpatrick (2011). *Lewin's Genes X*. Jones and Bartlett Publishers. USA. 930 p.
- Kubo, Y. e I. Furusawa (1991). *Melanin Biosynthesis: Prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of Colletotrichum and Pyricularia*. New York Plenum, pp. 205–18
- Li, L., C. Zheng, Y. Fu, D. Wu, X. Yang y H. Shen (2012). Silicate-mediated alleviation of Pb toxicity in banana grown in Pb contaminated soil. *Biol. Trace Elem. Res*. 145, 101-108.
- Madrigal, A. y O. Corrales (2000). Boost 50 SC, Plant Activator Which Improves Natural Resistance of Banana to Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) and Nematodes (*Radopholus similis*). Proceedings of the XIV ACORBAT Meeting, San Juan, Puerto Rico, Jul. 31- Aug. 4, p. 69.
- Manzo-Sánchez, G., H. Carrillo-Madrigal, S. Guzmán-González y M. Orozco-Santos (2012). Análisis de la sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra del banano a los fungicidas benomil, propiconazol y azoxistrobin. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 30(1), 81-85.
- Manzo-Sánchez, G., M. Orozco-Santos y S. Guzmán-González (2001). Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19(001), 66-71.

- Manzo-Sánchez, G., S. Guzmán-González, C. M. Rodríguez-García, A. James-Kay y M. Orozco-Santos (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa spp.* Revista Mexicana de Fitopatología. 23(001), 87-96.
- Manzo-Sánchez, G., M.-F. Zapater, F. Luna-Martínez, L. Conde-Ferráez, J. Carlier, A. James-Kay y J. Simpson (2008). Construction of a genetic linkage map of the fungal pathogen of banana *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak disease. Curr Genet. 53, 299-311.
- Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K.B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley y J. M. Rothberg (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 437(7057), 376-380.
- Marin, D. H., R. A. Romero, M. Guzmán y T. B. Sutton (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant disease*. 87(3), 208-222.
- Mehdy, M. C. (1994). Active Oxygen Species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol*. 105, 467-472.
- Mendoza-Rodríguez, M., A. Sánchez-Rodríguez, M. Acosta-Suárez, B. Roque, O Portal, E. Jiménez (2006). Construcción y secuenciación parcial de una biblioteca sustractiva en "Calcuta IV" (*Musa AA*) en estadio temprano de infección con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología vegetal*. 6(4), 213-217.
- Mendoza-Rodríguez, M., A. Sánchez-Rodríguez, O. Portal, M. Acosta-Suárez, B. Roque, M. Hofte y E. Jiménez (2008). Identificación de secuencias que se expresan

- diferencialmente en la interacción no compatible *Musa acuminata*-*Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología vegetal*. 8(1), 21-29.
- Merchán, V. M. y W. M. Chavarriaga (1994). Alternativas de manejo de Sigatoka negra en plátano Hartón (*Musa* AAB). *Memorias de la XI Reunión ACORBAT*. pp. 325-335.
- Merchan, V. V. (1998). Manejo de problemas fitosanitarios del cultivo del plátano en la zona central cafetalera in Seminario internacional sobre la producción de plátano. pp. 177-191.
- Mercure, E. W., B. Leite y R. L. Nicholson (1994). Adhesion of fungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 45, 421-440.
- Meredith, D. S. y J. S. Lawrence (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society*. 52(3), 459-476.
- Meredith, D. S. y J. S. Lawrence (1970). Black leaf streak disease of banana (*Mycosphaerella fijiensis*): susceptibility of cultivars. *Tropical agriculture*. 47, 273-287.
- Mobambo, K. N., C. Pasberg-Gauhl y K. Zuofa (1997). Host response to Black Sigatoka in *Musa* germplasm of different ages under natural inoculation conditions. *Crop protection*. 16(4), 359-363.
- Nicholson, R. L., H. Kunoh, T. Shiraishi y T. Yamada (1993). Initiation of the infection process by *Erysiphe graminis*: conversion of the conidial surface from hydrophobicity to hydrophilicity and influence of the conidial exúdate on the hydrophobicity of the barley leaf surface. *Physiol Mol Plant Pathol*. 43, 307-318.
- Nicholson, R. L., H. Yoshioka, N. Yamoka y H. Kunoh (1988). Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* II. Release of esterase enzyme from conidia in response to a contact stimulus. *Exp. Mycol.* 12, 336-349.

- Niño, J., Y. M. Correa y O. M. Mosquera (2011). *In vitro* evaluation of Colombian plant extracts against Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Archives of Phytopathology and plant protection. 44(8), 791-803.
- Nwauzoma, A. B., A. Tenkouano, J. H. Crouch, M. Pillay, D. Vuylsteke y L. A. Daniel-Kalio (2002). Yield and disease resistance of plantain (*Musa* spp., AAB group) somaclones in Nigeria. Euphytica. 123, 323-331.
- Orozco-Santos, M., J. Farias-Larios, G. Manzo-Sánchez y S. Guzmán-González (1983). Black Sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in México. Revista de Geografía agrícola. 10(1), 33-37.
- Orozco-Santos, M. (1998). Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. Folleto técnico No. 1. SAGAR, INIFAP, CIPAC. 95 p.
- Orozco-Santos, M., J. Farías-Larios, G. Manzo-Sánchez y S. Guzmán-González (2002). Manejo integrado de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) del banano en el trópico seco de México. In: ACORBAT. Memorias XV reunión. Realizada en Cartagena de Indias, Colombia. 27 de Octubre al 02 de Noviembre. pp. 119-124.
- Orozco-Santos, M., J. Orozco-Romero, O. Pérez-Zamora, G. Manzo-Sánchez, J. Farias-Larios y W. da Silva-Moraes (2008). Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra en bananos y plátanos. Tropical Plant Pathology. 33(3), 189-196.
- Ortiz, R. (1995). Musa genetics in: Bananas and Plantains S. Gowen (ed). Chapman y Hall. Londres. pp 84-109.
- Ortiz, R. y D. Vuylsteke (1994). Inheritance of Black Sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa* spp.) hybrids. Theor. Appl. Genet. 89, 146-152.
- Osherov N. y G. S. May (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. FEMS Microbiol Lett. 199, 153-160.
- Otálvaro, F., F. Echeverri, W. Quiñones, F. Torres y B. Schneider (2002). Correlation between Phenylphenalenone phytoalexins and phytopathological properties in *Musa* and the role of a Dihydrophenylphenalene triol. Molecules. 7, 331-340.

- Pasbergh-Gauhl, C.; L. Jácome; H. Cubero (2004). Effect of NIR Booster and Vigor Cal-Phos on Black Sigatoka and Growth of Banana. Proceedings of the XVI International ACORBAT Meeting, Oaxaca, México, sept. 29-oct 1, pp. 201-211.
- Pascholati, S. F., H. Deising, B. Leite, D. Anderson y R. L. Nicholson (1993). Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiol Mol. Plant Pathol.* 42, 37-51.
- Pascholati, S. F., H. Yoshioka, H. Kunoh y R. L. Nicholson (1992). Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*: cutinase is a component of the conidial exudate. *Physiol Mol Plant Pathol* 41, 53-59
- Pérez, L. (2000). Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) of Bananas and Plantains (*Musa* spp.): Advances in Disease Management». Proceedings of the XIV ACORBAT Meeting, San Juan, Puerto Rico, Jul. 31-Aug. 4.
- Pérez, L., L. Peñalver y M. Delgado (1981). Acción del aceite sobre el desarrollo de *Mycosphaerella musicola*, agente causal de la mancha de la hoja (sigatoka) en plátano. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Serie Protección de Plantas* 4(1), 49-57.
- Pérez, V. (2006). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra en bananos: estado actual y perspectivas. *Fitosanidad.* 10(1), 55-72.
- Perrier, X. E. de Langhe, M. Donohue, C. Lentfer, L. Vrydags, F. Bakry, F. Carreel, I. Hippolyte, J.-P. Horry, C. Jenyy, V. Lebot, A.-M. Risterucci, K. Tomekpe, H. Doutrelepont, T. Ball, J. Manwaring, P. de Maret y T. Denham (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *PNAS.* 108(28), 11311-11318.
- Ploetz, R. C. y K. G. Pegg (2000). Fusarium wilt in Diseases of Banana, Abacá and Enset. D. R. Jones (ed). CABI Publishing. Oxon, UK. pp. 143-159.
- Pontzen, R. (1997). Recent Developments in the Chemical Control of Plant Diseases. Resúmenes III Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal, Ciudad de La Habana, Junio 23-27, pp. 61 y 62.

- Portal, O., M. Acosta-Suárez, B. Ocaña, W. Schäfer, E. Jiménez y M. Höfte (2012). A green fluorescent protein-transformed *Mycosphaerella fijiensis* strain shows increased aggressiveness on banana. *Australasian Plant Pathol.*
- Portal, O., Y. Izquierdo, D. de Vleeschawer, A. Sánchez-Rodríguez, M. Mendoza-Rodríguez, M. Acosta-Suárez, B. Ocaña, E. Jiménez y Mónica Höfte (2011). Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*-banana interaction. *Plant Cell Rep.* 30(5), 913-928.
- Prentis, P. J., M. Woolfit, T.-H. R. Skye, D. Ortiz-Barrientos, A. Pavasovic, A. J. Lowe y P. M. Schenk (2010). Massively parallel sequencing and analysis of expressed sequence tags in a successful invasive plant. *Annals of Botany.* 106(6), 1009-1017.
- Prusky, D., J. L. McEvoy, B. Leverentz y W. S. Conway (2001). Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1105-1113.
- Quiñones, W., G. Escobar, F. Echeverri, F. Torres, Y. Rosero, V. Arango, G. Cardona y A. Gallego (2000). *Molecules.* 5, 974-980.
- Rodríguez-García, C. M., N. Raigosa-Flores, L. Conde-Ferráez, L. Peraza-Echeverría, B. Canto-Canché y A. James-Kay (2006). Variation in electrophoretic karyotype among Mexican isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Can. J. Plant. Pathol.* 28, 236-241.
- Rodríguez-García, C. M., L Peraza-Echeverría, I. R. Islas-Flores, B. B. Canto-Canché y R. Grijalva-Arango (2010). Isolation of retro-transcribed RNA from *in vitro* *Mycosphaerella fijiensis*-infected banana leaves. *Genetics and Molecular Research.* 9(3), 1460-1468.
- Rodríguez-Gaviria, P. A. y G. Cayón (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja del plátano. *Agronomía colombiana.* 26(2), 256-265.
- Romero, R. A: (2003). The spread, detection and impact of Black leaf streak disease and other *Mycosphaerella* species in the 1990s, in: *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica,

- Jacome, L., P. Lepoivre, D. Martin, R. Ortiz, R. Romero y J. V. Escalant (eds.). INIBAP. Roma. pp. 21-47.
- Romero, R. A. y T. B. Sutton (1997). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology*. 87(1), 96-100.
- Romero, R. A. y T. B. Sutton (1998). Characterization of Benomil-resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of Black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant disease*. 82(8), 931-934.
- Ronaghi, M., S. Karamohamed, B. Pettersson, M. Uhlen y P. Nyren (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem*. 242(1), 84–89.
- Rumbolz, J., H. H. Kassemeyer, V. Steinmetz, H. B. Deising, K. Mendgen, D. Mathys, S. Wirtz y R. Guggenheim (2000). Differentiation of infection structures of the powdery mildew fungus *Uncinula necator* and adhesion to the host cuticle. *Can J Bot*. 78, 409–421.
- Sánchez-Rodríguez, A., C. Martens, K. Engelen, Y. Van de Peer y K. Marchal (2010). The potencial for pathogenicity was present in the antecesor of the Ascomycete subphylum Pezizomycotina. *BMC Evolutionary biology*. 10(318).
- Sánchez-Rodríguez, A., O. Portal, L. E. Rojas, B. Ocaña, M. Mendoza, M. Acosta, E. Jiménez y M. Höfte (2008). An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis-Musa spp.* interaction. *Mol Biotechnol*. 40, 299-305.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74(12), 5463-5467.
- Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis y P. O. Brown (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *270(5235)*, 467–470.

- Schoch, C. L., R. A. Shoemaker, K. A. Seifert y S. Hambleton (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*. 98(6), 1041-1052.
- Scott, M. R. D., K.-H. Wepstphal, y P. W. J. Rigby (1983). Activation of mouse genes in transformed cells. *Cell*. 34(2), 557-567.
- Shendure, J. y H. Ji (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*. 26(10), 1135-1145.
- Simmonds, N. W. y K. Sheperd (1955). The taxonomy and origins of cultivated bananas. *J Lynn Soc*. 55, 302-312.
- Sisler, H. D. (1996). Chemistry and Mode of Action of Sterol ByosynthesisInhibitors. Characteristics of Fungal Resistance to Sterol 14cDemethylase Inhibitors. 4th Meeting of FRAC Banana Working Group,cMiami, Jan. 25-26.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (2011). Cierre de la producción agrícola por Estado. [Online] Disponible en: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=35](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=35). [Acceso 01 de Abril del 2013].
- Sohn, J., R. T. Voegelé, K. Mendgen y M. Hahn (2000). High level activation of vitamin B1 biosynthesis genes in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *MPMI*. 13(6), 629-636.
- Sreeramanan, S. M. Maziah, N. M. Rosli, M. Sarriá y R. Xavier (2006). Particle bombardment mediated co-transformation of chitinase and  $\alpha$ -1,3-glucanase genes in banana. *Biotechnology*. 5(2), 203-216.
- Stewart, E. L., Z. Liu, P. W. Crous y L. Szabo (1999). Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of *Mycosphaerella* based on rDNA sequence analysis. *Mycological Research* 103, 1491-1499.
- Stover, R. H. (1980). Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. *Plant disease*. 64(8), 750-756.

- Stover, R. H. (1986). Disease management strategies and the survival of the banana industry. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 83-91.
- Struck C., M. Hahn, K. Mendge (1996). Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in spores, germ tubes, and haustoria of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Fungal Genet Biol.* 20, 30-35.
- Su, Z., B. Ning, H. Fang, H. Hong, R. Perkins, W. Tong y L. Shi (2011). Next-Generation Sequencing: A revolutionary tool for toxicogenomics. *General Applied and Systems Toxicology*.
- Suzuki, S., Y. Komiya, T. Mitsui, S. Tsuyumi, H. Kunoh, T. L. W. Carver y R. L. Nicholson (1998). Release of cell wall degrading enzymes from conidia of *Blumeria graminis* on artificial substrata. *Ann Phytopathol Soc Jpn.* 64, 160–167.
- Taiz, L. y E. Zeiger (2010). *Plant Physiology*. Sinauer Associates Inc. 782 p.
- Takano, Y., T. Kikuchi, Y. Kubo, J. E. Hamer, K. Mise y I. Furusawa (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *MPMI.* 13(4), 374-383.
- Talbot, N. J., D. J. Ebbole, J. E. Hamer (1993). Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* 5, 1575-1590.
- Talbot, N. J., M. J. Kershaw, G. E. Wakley, O. M. H. de Vries, J. G. Wessels y J. E. Hamer (1996). *MPG1* encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* 8, 985-999.
- Terhune, B. T., R. J. Bojko y H. C. Hoch (1993). Deformation of stomatal guard cell lips and microfabricated artificial topographies during appressorium formation by *Uromyces*. *Exp Mycol.* 17, 70–78.
- Thwaites, R., S. J. Eden-Green y R. Black, (2000). Diseases caused by bacteria in Diseases of Banana, Abacá and Enset. D. R. Jones (ed). CABI Publishing. Oxon, UK. pp. 213-239.

- Tiemann, R., D. Berg, W. Krämer y R. Pontzen (1997). Biochemistry of the New Fungicide KWG 4168 (Spiroxamine). *Pflanzenchutz-Nachrichten Bayer*. 50, 29-48.
- Torres, J., H. A. Rodríguez, E. Rodríguez y R. Arango (2009). Aspectos bioquímicos de la resistencia del banana (*Musa acuminata*) al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Tumbaga*. 4, 85-96.
- Torres, J., R. Arango y M. Ocampo (2007). Inducción de la actividad Pal y  $\beta$ -1,3 glucanasa en interacciones compatibles e incompatibles en banano (*Musa acuminata*) durante la infección por *Mycosphaerella fijiensis* bajo condiciones controladas. Trabajo de pregrado. Programa de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima.
- Trade and Market division (2011). Banana statistics. Food and Agriculture Organization.
- Twizeyimana, M., P. S. Ojiambo, A. Tenkouano, T. Ikotun y R. Bandyopadhyay (2007) Rapid screening of *Musa* species resistance to black leaf streak using *in vitro* plantlets and detached leaves. *Plant Dis*. 91, 308-314.
- Uchiyama, T. y K. Okuyama (1990). Participation of *Oryza sativa* leaf wax in appressorium formation by *Pyricularia oryzae*. *Phytochemistry*. 29, 91-92.
- Valerio, R., H. Lindorf y E. García-de García (2002). Anatomía foliar comparada de ocho cultivares de banano con relación a la resistencia o susceptibilidad a la Sigatoka (amarilla y negra). *Agronomía Tropical*. 52(4), 507-521.
- Vázquez-Castrejón, R. A., J. Romero-García, J. Figuero-Aviera y M. Munro-Olmos (2005). Paquete tecnológico para el cultivo del plátano. Gobierno del Estado de Colima. 72 p.
- Velculescu, VE., L. Zhang, B. Vogelstein y KW. Kinzler (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*. 20(270), 368-9-371.
- Vicente-Lazo, J., J. A. Muñoz y A. Escalona (2012). Evaluación experimental del clorotalonil en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plantaciones de plátano (*Musa spp.* AAB). *Bioagro*. 24(2), 127-134.

- Villalta, R. y M. Guzmán (2005). Capacidad de esporulación de *Mycosphaerella fijiensis* en tejido foliar de banano depositado en el suelo y efecto antiesporulante de la urea. In: 1er Congreso Científico Técnico Bananero Nacional. Pococí, Limón, Costa Rica. Resúmen. p. 14.
- Vindas, R., F. Ortíz, V. Ramírez y P. Cuenca (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 52(3), 601-609.
- Vishnevetsky, J., T. L. White Jr., A. J. Palmateer, M. Flaishman, Y. Cohen, Y. Elad, M. Velcheva, U. Hanania, N. Sahar, O. Dgani y A. Perl (2011). Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv. Grand Nain. Transgenic Res. 20, 61-72.
- Voegele R. T., C. Struck, M. Hahn, K. Mendgen (2001). The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. Proc Natl Acad Sci USA. 98, 8133–8138.
- Washington, J. R., J. Cruz, F. López y M. Fajardo (1998). Infection studies of *Mycosphaerella fijiensis* on banana and the control of Black Sigatoka with Chlorothalonil. Plant disease. 82(11), 1185-1190.
- Webster, J. y R. W. S. Weber, 2007. Introduction to fungi. Cambridge University Press. (3<sup>o</sup> ed.) New York. 841 p.
- Welsh, J., K. Chada, S. S. Dalal, R. Cheng, D. Ralph y M. McClelland (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nucleic Acids Res. 20(19), 4965-4970.
- Wheeler, D. A., M. Srinivasan, M. Egholm, Y. Shen, L. Chen, A. McGuire, W. He, Y. J. Chen, V. Makhijani, G. T. Roth, X. Gomes, K. Tartaro, F. Niazi, C. L. Turcotte, G. P. Irzyk, J. R. Lupski, C. Chinault, X. Z. Song, Y. Liu, Y. Yuan, L. Nazareth, X. Qin, D. M. Muzny, M. Margulies, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs y J. M. Rothberg (2008). The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. Nature. 452(7189), 872-876.

- Woloshuk, C. P. y H. D. Sisler (1982). Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. J. Pestic. Sci. 7, 161-166.
- Wright, A. J., T. L. W. Carver, B. J. Thomas, N. I. D. Fenwick, H. Kunoh y R. L. Nicholson (2000). The rapid and accurate determination of germ tube emergence site by *Blumeria graminis* conidia. Physiol Mol Plant Pathol. 57, 281-301.
- Xiao, J.-Z., A. Ohshima, T. Kamakura, T. Ishiyama e I. Yamaguchi (1994). Extracellular glycoprotein(s) associated with celular differentiation in *Magnaporthe grisea*. Mol. Plant-Microve Interact. 7, 639-644.
- Yang, B. J. y S. B. Zhong, (2008). Fourteen polymorphic microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. Molecular Ecology Resources. 8, 910-912.
- Zapater, M.-F., M. Duchemin, J.-F. Dussart, D. Coste, P. Brottier y J. Carlier (2008). Microsatellite markers for the fungal banana pathogens *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella eumusae*. Molecular ecology resources. 8, 1121-1125.
- Zhang, C., Y. Xia y Z. Li (2011). Identification of genes differentially expressed by *Metarhizium anisoplae* growing on *Locusta migratoria* wings using Suppression Subtractive Hybridization. Current Microbiology. 62, 1649-1655.
- Zhang, W., D. Y. Han, W. A. Dick, K. R. Davis y H. A. Hoitink (1998). Compost and compost water extract-induced Systemic Acquired Resistance in cucumber and *Arabidopsis*. Phytopathology. 88(5), 450-455.
- Zuluaga-Amaya, C. M., L. F. Patiño-Hoyos y J. C. Collazos-Villa (2007). Integración de inducción de resistencia con bacterias quitinolíticas en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. Revista Facultad de Agronomía-Medellín. 60(2), 3891-3905.



## INFECCIÓN DE *Musa acuminata* cv. Gran enano POR *Mycosphaerella fijiensis* EN CONDICIONES *in vitro*

### 2.1.- INTRODUCCIÓN

El cultivo del banano, al igual que muchas plantas de interés agronómico, presenta una gran variedad de patógenos que tienen un efecto negativo en la salud de la planta y por ende en la producción de frutos, de estos los hongos representan el grupo más importante debido al impacto que generan (Jones, 2000); para lograr un mejor control sobre ellos se han realizado diversos estudios que tratan de emular las condiciones de infección que se presentan en campo y así reproducirlas en el invernadero y/o laboratorio, de tal manera que representen una mejora en condiciones operativas, de espacio y económicas.

#### 2.1.1.- Bioensayos para el estudio de la interacción *Mycosphaerella fijiensis*-Banano

Los bioensayos utilizados para el estudio de la interacción *M. fijiensis*-*Musa* sp. Se basan en el uso de plantas de distintas edades (o partes de las mismas), de tal manera que se puedan simular el proceso de infección que se da en condiciones naturales; esto debido a que los estudios en campo requieren mayores recursos tanto de tiempo como financieros así como también presentan una alta variabilidad debido a las condiciones ambientales (Donzelli y Churchill, 2007).

Meredith y Lawrence (1969), fueron de los primeros en utilizar plantas de invernadero al estudiar el desarrollo de los síntomas de la enfermedad; este enfoque es uno de los más cercanos a la respuesta de plantas de campo (pues utiliza plantas completas y desarrolladas fisiológicamente), sin embargo presenta el inconveniente de que se requieren meses para que las plantas alcancen la madurez necesaria para su utilización en estudios.

Por lo anterior, se han ideado diversas técnicas *in vitro*; una de ellas es el uso de plántulas provenientes de cultivo de tejidos, las cuales además de garantizar sanidad, permitir ahorrar tiempo y espacio también presentan una respuesta similar a las plantas adultas según Churchill (2011) y Mourichón *et al.*, (1987).

Contrariamente, Alvarado-Capó *et al.* (2003) reportaron que el cultivar Yangambi Km 5 (cultivar resistente) mostró síntomas similares a los que presentaron cultivares susceptibles, esta misma observación fue reportada por Fullerton y Olsen (1995) quienes observaron que el cultivar Calcutta IV (cultivar resistente) mostró los síntomas típicos de la Sigatoka negra adjudicando esta respuesta a que existen genes en el cultivar que se expresan sólo cuando ésta ha alcanzado su madurez activando los diversos mecanismos de defensa; esto representa una limitante para el uso de plántulas en estudios de interacción planta-patógeno.

Una técnica que ha cobrado fuerza en años recientes para el estudio de patosistemas es el cultivo de fragmentos foliares, en el cual se usan secciones de hojas adultas con el fin de simular la respuesta más adecuada por parte del hospedero así como también asegurar que la infección inducida sea lo más semejante a la observada en campo. A continuación se hace una descripción más detallada de la técnica.

#### **2.1.1.1.- Uso de fragmentos foliares**

Esta técnica se conoce desde 1850 cuando se utilizaba para observar fenómenos como la absorción de agua, transpiración, respiración y fotosíntesis. Actualmente se utiliza para diversos propósitos entre ellos: estudiar el desarrollo de la hoja, la interacción de diversos patógenos con sus hospederos e inclusive la interacción de otros organismos con los patógenos (Yarwood, 1946).

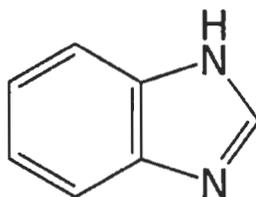
Yarwood (1946) describió al uso de fragmentos foliares como el mantenimiento de hojas en condiciones tales que les permitan seguir viviendo por varios períodos después de su corte de la planta de la cual formaban parte. El uso de fragmentos foliares ha representado una gran ventaja ya que permite la comparación de una gran cantidad de cultivares y aislados de patógenos en un mismo experimento, además de que permite ajustar las condiciones ambientales, lo cual como se ha mencionado anteriormente, representa una de las mayores limitantes de los estudios en campo.

Abadie *et al.* (2008) destacaron el valor de esta técnica al mencionar que se disminuye la intervención de otros factores (bióticos y abióticos) en el proceso de interacción además de que permite observar los diversos estados de la enfermedad.

A diferencia de los anteriores, Townley *et al.* (2001) reportaron que el desarrollo de la enfermedad es notoriamente diferente de aquellas hojas que no son retiradas de la planta, con lo cual concluyeron que los síntomas no pueden correlacionarse con los que se presentaban en las plantas completas. Sin embargo, Omolara (2008), afirma que si se necesita estudiar la capacidad patogénica del hongo, el uso de fragmentos foliares resulta una de las técnicas más adecuadas para este fin.

Leiva-Mora *et al.* (2010) afirmaron que el uso de fragmentos foliares no es una técnica adecuada para el estudio de la interacción planta-patógeno debido a que no se logra completar el ciclo de vida del organismo invasor en gran parte por el proceso de senescencia de los fragmentos; el cual se ha observado dentro de las primeras 24 h después del corte si se mantiene sin humedad o dentro de los primeros 24 días si las condiciones lo permiten (Yarwood, 1946). También se ha visto que este período disminuye cuando se han cortado fragmentos de plantas monocotiledóneas, mientras que en dicotiledóneas suele ser más prolongado, en parte, debido a que los fragmentos foliares de dicotiledóneas poseen carbohidratos complejos los cuales proporcionan la energía necesaria para mantener las funciones celulares mientras en la mayoría de las monocotiledóneas los carbohidratos presentes son azúcares solubles (Yarwood, 1946).

Se han buscado compuestos que inhiban la senescencia de los fragmentos y con ello, evitar el efecto de este proceso en la obtención de los resultados. Uno de los más utilizados en los estudios con fragmentos foliares es el Bencimidazol (N,N'-metilfenil-o-fenilenediamina) (ver figura 7); este compuesto retarda el proceso de senescencia a la vez que permite que se mantengan moléculas importantes para el metabolismo vegetal como la clorofila, ARN y proteínas, además evita que se aumente la tasa respiratoria de los tejidos lo que podría llevar a la generación de especies reactivas de oxígeno, con la posterior oxidación de las biomoléculas (Singh y Mishra, 1975; Person *et al.*, 1957).



**Figura 7.-** Estructura del Bencimidazol (Imagen tomada de <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/finechem/BENZIMIDAZOLE.htm>)

#### **2.1.1.1.1.- Aplicación del uso de fragmentos foliares en estudios de interacción planta-patógeno**

La técnica del uso de fragmentos foliares se ha aplicado en repetidas ocasiones para estudiar la interacción entre los componentes de varios patosistemas, en el cuadro 13 se muestran algunos de los trabajos que han reportado su uso. Como se puede observar, la técnica se ha empleado para cubrir una gran variedad de propósitos tales como: conocer los mecanismos de patogenicidad o defensa, descripción caracterización y cuantificación de la expresión de genes relacionados con la interacción, evaluación de nuevos cultivares, entre otros.

##### **2.1.1.1.1.1.- Aplicación del uso de fragmentos foliares en estudios de interacción banano-*Mycosphaerella fijiensis***

El Hadrami (2000) desarrolló ensayos en fragmentos de hojas *in vitro* de diferentes cultivares de bananos, siendo el pionero de esta técnica en nuestro cultivo de interés, sin embargo su trabajo sólo fue publicado en Bélgica.

Para evaluar la resistencia de los genotipos FHIA Pérez-Vicente *et al.* (2006) utilizaron el sistema de fragmentos foliares en segmentos de 9 cm<sup>2</sup> comparándolo con infección en condiciones de campo; como resultado de su trabajo determinaron que la infección en fragmentos avanzaba más rápido en comparación con la de las plantas de campo. También observaron que en el cultivar Gran enano se incrementó el número de lesiones durante el tiempo del experimento en todas las concentraciones de inóculo, ya que de entre las concentraciones de 0, 4, 8, 12, 20 y 40 conidios/cm<sup>2</sup>, esta última mostró el mayor número de lesiones a los 20 días. Sin embargo, un aspecto negativo que los autores comentan fue el hecho de que usando 40 mg/L de Bencimidazol, los fragmentos

foliares presentaron una gran variación en la supervivencia de los mismos, aún provenientes de la misma hoja.

Twizeyimana *et al.* (2007) evaluaron la reacción de diversos cultivares a la infección por *M. fijiensis* en plántulas y fragmentos foliares, observando que en el primer sistema las lesiones aparecían más rápidamente que con los fragmentos, además concluyeron que, aunque con micelio fragmentado se obtenían síntomas de infección en un tiempo más corto, el uso de conidios como fuente de inóculo era más adecuado debido a que se tenía mayor homogeneidad en la concentración.

Abadie *et al.* (2008) reportaron que con el uso de fragmentos foliares se obtenían los primeros síntomas de 18 a 20 días después de la inoculación y a los 30 días comenzaban a aparecer las primeras lesiones necróticas; sin embargo también observaron que el ajuste de las condiciones climáticas de la zona donde se mantuvieron los fragmentos foliares afectó la homogeneidad de las lesiones así como también fue un factor decisivo para que evitar la mortalidad de los fragmentos.

Cavalcante *et al.* (2011) estudiaron la interacción de *M. fijiensis* con varios genotipos de banano con diversas respuestas ante la Sigatoka negra (resistentes, tolerantes y susceptibles). En su estudio observaron que a las 24 h el 97% de los conidios habían germinado independientemente del genotipo en el cual fueron inoculados, además de que la suspensión conidial se había esparcido homogéneamente sobre el tejido foliar. La penetración de los estomas, uno de los eventos principales en la interacción planta-hongo, se observó a los 5 días posteriores a la inoculación y en algunas ocasiones fue evidente la presencia de estomatopodios. Veintiún días después de iniciado el experimento, el cultivar Gran enano presentó una mayor cantidad de estomas penetrados a diferencia de Calcuta IV y Pisang Madu, los cuales son resistente y parcialmente resistente, respectivamente. Además, estos autores observaron mediante técnicas de tinción y observaciones microscópicas, una disminución de la concentración de clorofila, lo cual corresponde con las observaciones de Rodríguez-Gaviria y Cayón *et al.* (2008) e Hidalgo *et al.* (2006) sobre la disminución de la fotosíntesis durante el proceso de infección por *M. fijiensis*.

En el presente trabajo se realizaron observaciones macro y microscópicas de los principales eventos que acontecen durante la interacción de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran enano con *Mycosphaerella fijiensis*.

**Cuadro 13.-** Uso de la técnica de fragmentos foliares en diversos estudios de interacción planta-hongo

Referencia	Hospedero	Hongo patógeno	Objetivo del estudio
Reglinski <i>et al.</i> , 1995	Lechuga ( <i>Lactuca sativa</i> )	<i>Botrytis cinerea</i>	Evaluación del efecto de extractos obtenidos con disolventes orgánicos sobre el desarrollo de la enfermedad
Benito <i>et al.</i> , 1998	Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	<i>Botrytis cinerea</i>	Descripción de los principales eventos de la enfermedad
Felsenstein <i>et al.</i> , 1998	Trigo ( <i>Triticum sativum</i> )	<i>Puccinia recondita</i>	Evaluación de la respuesta del hospedero a la infección
Arraino <i>et al.</i> , 2001	Trigo ( <i>Triticum sativum</i> )	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Evaluación de la respuesta del hospedero a la infección
Metz <i>et al.</i> , 2011	Césped "San Agustín" ( <i>Stenotaphrum secundatum</i> )	<i>Magnaporthe oryzae</i>	Evaluación de la respuesta del hospedero a la infección
de Gruyter <i>et al.</i> , 2012	Papa ( <i>Solanum tuberosum</i> ) y Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	<i>Stagonosporopsis andigena</i> y <i>S. crystaliniformis</i>	Desarrollo de diagnóstico por qPCR

## 2.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio, se utilizaron plantas de *Musa acuminata* cv. Gran Enano (genotipo susceptible) proporcionadas por la QFB. Rosa Grijalva Arango. La cepa usada fue *Mycosphaerella fijiensis* CIRAD C1233, aislada de plantas de *Musa acuminata* de la Península de Yucatán con número de acceso IMI 392976 del International Mycological Institute (Rodríguez-García *et al.*, 2007).

Para promover el crecimiento de *M. fijiensis*, se colocaron fragmentos de micelio en cajas Petri o matraces (dependiendo de la consistencia del medio) con medio de cultivo V8C del cual se presenta su composición en el cuadro 14.

**Cuadro 14.-** Composición del medio de cultivo V8C (Mourichon *et al.*, 1987 modificado por Puch, 2001).

Componente	Concentración
CaCO <sub>3</sub>	2 g/L
Jugo V8	200 mL/L
Agar	20 g/L

Una vez colocados los fragmentos en el medio las cajas Petri se incubaron por un período de 10-15 días a una temperatura de 25-30 °C. Cuando las colonias tuvieron un tamaño considerable se inició la etapa de esporulación, la cual involucró la utilización del medio V8E cuya composición se presenta en el cuadro 15 ajustado a un pH de 6.0.

Una vez preparadas las cajas Petri con medio V8E, se cortaron con un bisturí estéril fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de la parte más joven de la colonia. Estos se depositaron en un mortero estéril, se maceraron por 5 min con 2 mL de agua destilada estéril, agregando la cantidad que se consideró necesaria, se homogenizaron y se utilizaron 2.4 mL del macerado en las cajas con el medio V8E, realizando movimientos para distribuirlo uniformemente. Las cajas Petri se incubaron por seis días a una temperatura de 20 ± 2 °C con luz blanca y ultravioleta de forma continua.

Como primer paso para la preparación de los fragmentos foliares se prepararon cajas Petri con agar y Bencimidazol (al cual en lo sucesivo se le denominará medio AB)

siguiendo el protocolo de El Hadrami (2000) modificado por el grupo de la Dra. Rodríguez-García (comunicación personal).

**Cuadro 15.-** Composición del medio de cultivo V8E (Puch-Ceh, 2001).

<b>Componente</b>	<b>Composición</b>
CaCO <sub>3</sub>	0.2 g/L
Jugo V8	100 mL/L
Agar	20 g/L

En ambiente estéril se filtró la solución de Bencimidazol usando un equipo NALGENE para esterilización de líquidos por filtración, con una membrana de 0.22 µm. Para completar el medio final se mezclaron en partes iguales el agar (el cual estaba a una temperatura aproximada de 60-80 °C) y la solución de Bencimidazol y se procedió a vaciar en cajas Petri; una vez solidificado el medio se sellaron las cajas y se guardaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Para obtener los fragmentos foliares se realizó un corte desde el peciolo de las dos primeras hojas de plantas crecidas en condiciones de invernadero de aproximadamente 4-6 meses de edad. Las hojas se depositaron en un vaso deprecipitado de 1L con 250 mL de agua de la llave para mantenerlas húmedas.

Una vez en el laboratorio se procedió a limpiar ambas superficies de las hojas (haz y envés) con algodón y agua destilada para eliminar el exceso de polvo, después se retiró la nervadura principal. En un área estéril se procedió a desinfectar las hojas, depositándolas en 2 L de una dilución de hipoclorito de sodio comercial (dilución 7:10 con una concentración final de 4.2%) por aproximadamente 13 min en agitación manual continua en sentido de las manecillas del reloj y en sentido contrario.

Posteriormente se retiró la solución y se aplicaron 3 lavados con agua destilada estéril; enseguida se secaron las hojas sobre papel estéril. Los fragmentos foliares se cortaron en fragmentos de aproximadamente 25 cm<sup>2</sup> utilizando un bisturí estéril. Posteriormente cada fragmento (con el envés hacia arriba) se colocó en medio AB insertando los bordes del fragmento en el gel, para que la hoja estuviera en contacto con el Bencimidazol, el cual actuó como un agente retardador de la senescencia.

Para cosechar los conidios producidos por la cepa C1233 de *M. fijiensis* se tomaron 2.4 mL (en alícuotas de 800 µL) de una solución estéril 1% de grenetina y se depositaron sobre la caja a cosechar, para después con un pincel realizar barridos suaves sobre la superficie de las colonias.

Cuando se terminaron de cosechar todas las cajas se procedió al conteo de los conidios, el cual se realizó por microscopía óptica usando una cámara Sedgwick-Rafter, con un volumen de 1.2 mL (realizando diluciones con grenetina al 1%). Cuando la suspensión de conidios se depositó en la cámara se esperaron aproximadamente 3 minutos para permitir que éstos sedimenten y evitar errores en la lectura.

Para determinar la concentración de conidios se contaron cinco campos del cuadrante superior izquierdo, cinco del inferior izquierdo, cinco de la parte central, cinco del cuadrante superior derecho y cinco en el cuadrante inferior derecho, realizando esta operación por duplicado con alícuotas diferentes. Se calculó el promedio de ambas lecturas para después obtener la concentración mediante la siguiente fórmula (Hötzel y Croome, 1999):

$$\text{Concentración} \left( \frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right) = \frac{\Sigma N * 1000 \text{ mm}^3}{A * D * F} * \text{Factor de dilución}$$

Dónde:

N: Número de células contadas.

A: Área del campo (mm<sup>2</sup>)

D: Profundidad del campo (mm)

F: Número de campos contados.

A continuación se realizó una dilución en grenetina al 1% para ajustar el número de los conidios a 200 conidios/µL. Después se agregaron 125 µL de inóculo a cada uno de los fragmentos foliares, dispersando suavemente el mismo sobre la superficie de la hoja, selladas las cajas se incubaron a una temperatura de 26-30 °C con un fotoperíodo

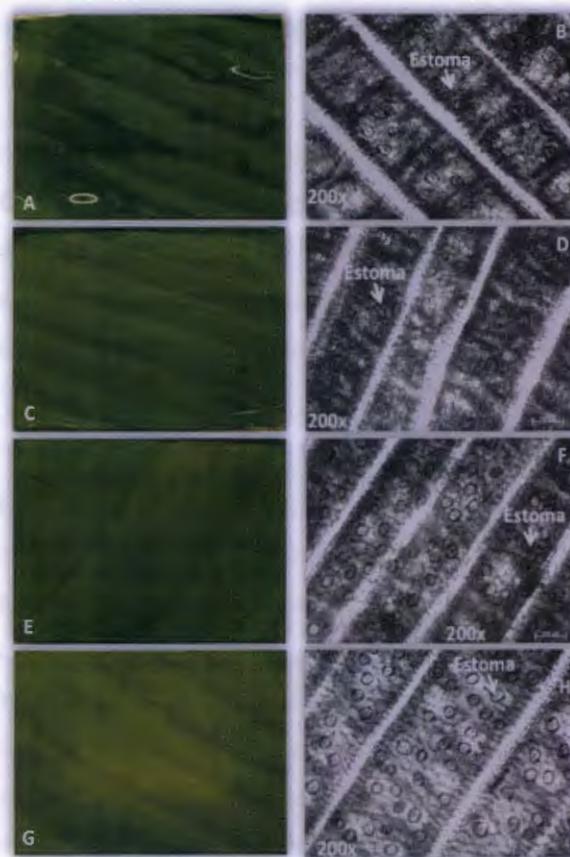
de 12h/12h en luz blanca por 10 días, realizando muestreos a los 0, 3, 5 y 10 días después de inoculación (ddi).

Para observar el proceso de infección a nivel microscópico se cortaron partes del fragmento foliar tomado del muestreo correspondiente (0, 3, 5 y 10 ddi), se tiñeron con 16  $\mu$ L de una solución de Azul de anilina al 1%, se dejaron reposar aproximadamente 10 minutos y se observaron mediante un microscopio Axioplan Zeiss 20X acoplado a una computadora, las imágenes se obtuvieron usando el Software ActionVision 3.1©.

### 2.3.- RESULTADOS

A través del cultivo de *M. fijiensis* cepa C1233 en medio de esporulación V8E se lograron obtener  $43.04 \times 10^4$  conidios/mL con los cuales se inocularon fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran enano; para asegurar que durante nuestro estudio los efectos observados se debieron exclusivamente a la interacción *M. fijiensis*-*Musa acuminata* cv. Gran enano se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas de los fragmentos tratados en condiciones control (tratados con solución de grenetina al 1%). Se observó que ninguno de estos fragmentos foliares presentó lesiones o contaminación aparente a nivel macroscópico; cuando se realizaron las correspondientes tinciones se corroboró esta observación al notar que en la superficie de los fragmentos no se encontraba microorganismo alguno hasta los 10 días después de iniciado el experimento (figura 8).

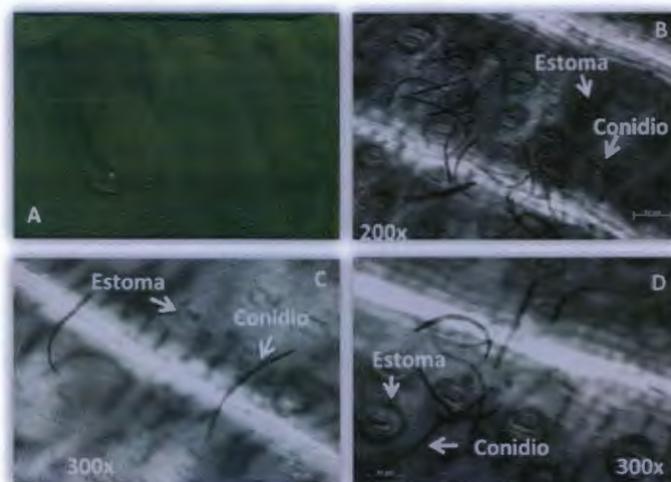
Como se puede apreciar en la figura 9 se depositaron los conidios sobre la superficie de los fragmentos foliares quedando distribuidos de manera heterogénea, esto debido a que las ceras de la superficie del tejido no permitían que la suspensión conidial se dispersara adecuadamente, quedando zonas con pocos conidios como se muestra en la figura 9C. Tres días después de su inoculación los conidios ya habían germinado completamente generando su respectivo tubo germinativo en ambos polos de la espora (figura 10).



**Figura 8.-** Fotografías y micrografías de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran Enano en condiciones control a 0 días (a y b), 3 días (c y d), 5 días (e y f) y 10 días (g y h).

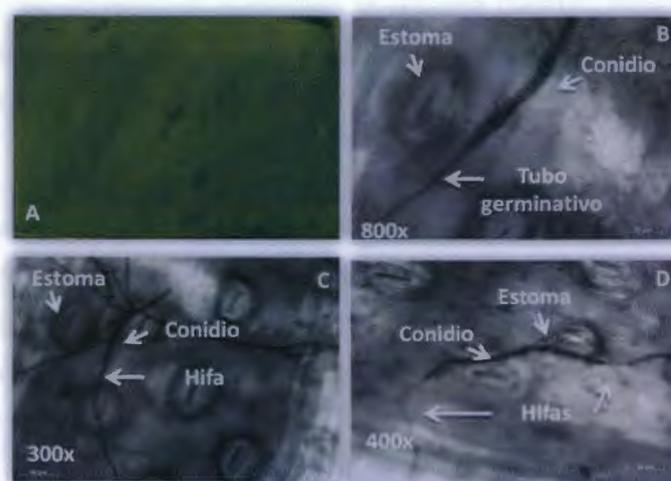
En los 5 días posteriores a la inoculación de los fragmentos se observó el desarrollo de micelio del hongo así como también la penetración de los estomas, siendo este último uno de los principales eventos de la interacción temprana (figura 11).

A los 10 días el micelio cubrió casi totalmente la superficie vegetal dejando muy pocas zonas libres del mismo. En estas mismas se logró observar de nuevo la penetración del hongo en aquellos estomas que aún estaban libres de infección (figura 12). Durante 10 días no se observó ninguna lesión aparente a nivel macroscópico en los fragmentos inoculados con esporas de *M. fijiensis*.

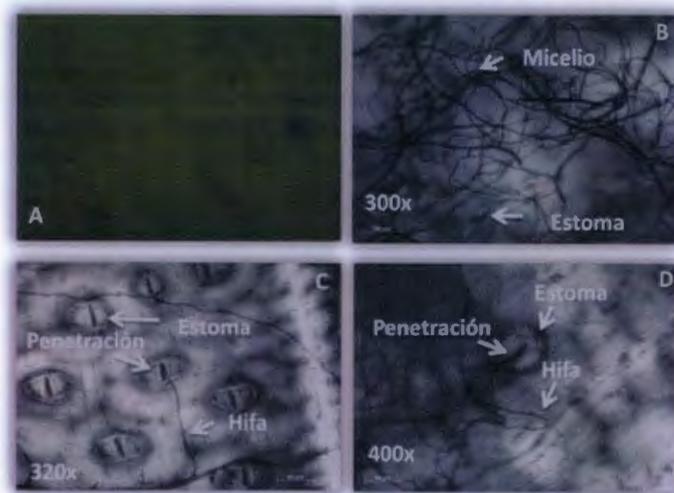


**Figura 9.-** Fotografía y micrografías de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran Enano infectados con *P. fijiensis* cepa C1233 a 0 días de su inoculación.

Como se puede observar en la figura 13 ninguno de los fragmentos mantenidos en agar agua presentó lesión alguna a los 10 días lo que nos puede sugerir que las interacciones que se produjeron entre *M. fijiensis* y los fragmentos foliares de *Musa acuminata* no se relacionaron con procesos de senescencia sino a la susceptibilidad inherente del cultivar.



**Figura 10.-** Fotografía y micrografías de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran Enano infectados con *M. fijiensis* cepa C1233 a 3 días de su inoculación.



**Figura 11.-** Fotografía y micrografías de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran Enano infectados con *M. fijiensis* cepa C1233 a 5 días de su inoculación.

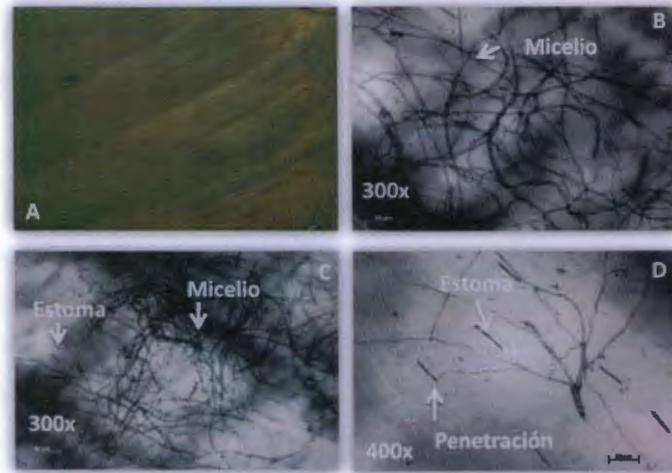
#### 2.4.- DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, la técnica de los fragmentos foliares ha generado distintas opiniones sobre su aplicación en el estudio de la interacción planta-patógeno. Sin embargo, esto no limitó su uso en el patosistema *Mycosphaerella fijiensis-Musa acuminata*, donde permitió estudiar la respuesta de distintos genotipos permitiendo clasificarlos de acuerdo a su grado de resistencia. En todos los estudios quedó claro que para lograr la infección del material vegetal era necesario contar con suficiente material fúngico.

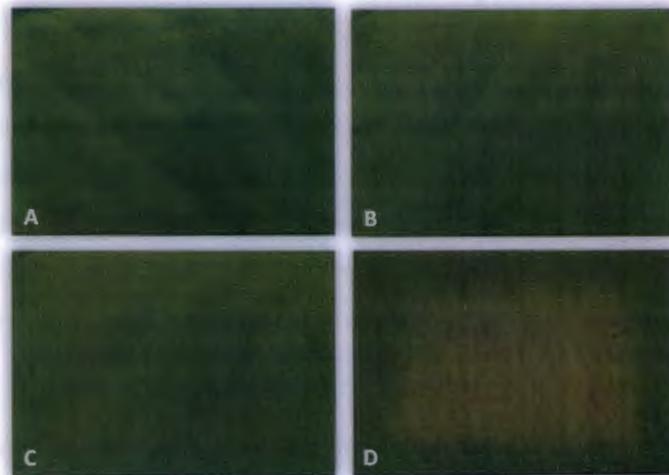
En este trabajo, fue necesario obtener una cantidad suficiente de esporas asexuales (conidios) de *M. fijiensis* para reproducir la infección *in vitro*, para ello se realizó la cosecha de las mismas del medio V8 de esporulación y su correspondiente conteo obteniéndose el siguiente resultado el cual se comparó con otros estudios:

**Cuadro 16.-** Comparación de la producción de conidios de *Mycosphaerella fijiensis*.

	Conidios Producidos en este estudio	Peraza-Echeverría <i>et al.</i> , 2008	Sepúlveda <i>et al.</i> , 2009	Hanada <i>et al.</i> , 2002
Conidios/mL	$0.4304 \cdot 10^6$	$0.260 \cdot 10^6$	$0.260 \cdot 10^6$	$0.19 \cdot 10^6$



**Figura 12.-** Fotografía y micrografías de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran Enano infectados con *M. fijiensis* cepa C1233 a 10 días de su inoculación.



**Figura 13.-** Fotografías de fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran Enano cultivados en medio Agar agua a 0 (A), 3 (B), 5 (C) y 10 días (D).

Entre los múltiples factores involucrados en las diferencias en el número de conidios producidos encontramos el tipo de luz y la duración de su intensidad ya que Hanada *et al.* (2002) utilizaron un fotoperíodo de 5 días en oscuridad y 5 días de luz continua mientras que en los otros estudios (incluido el nuestro) se aplicó luz durante un período de 12 h diarias. En cuanto al tipo de luz observamos que la aplicación de luz roja (Sepúlveda *et al.*, 2009) produjo la misma cantidad de conidios que la aplicación de luz blanca + luz ultravioleta utilizada en el estudio de Peraza-Echeverría *et al.* (2008). Sin embargo, tomando en cuenta nuestros resultados podemos pensar que este último tratamiento produce mejores resultados.

En el caso de la concentración de  $\text{CaCO}_3$ , Hanada *et al.* (2002) utilizaron diez veces más que en los otros trabajos, esto podría indicar que una menor concentración de este compuesto podría servir como estímulo para una mayor producción de conidios; con respecto a esto Biggs *et al.* (1997) observaron el efecto de diversas sales de Calcio en el crecimiento e infección de *Monilia fruticola* sobre duraznos, encontrando que, independientemente del anión, en muchos casos la adición de Calcio inhibió profundamente el crecimiento, la producción de poligalacturonasas y el proceso de infección del hongo sobre el fruto. Mendoza *et al.* (1993) observaron que el ión Calcio es uno de los inductores más importantes para la formación de cuerpos escleróticos en *Cladosporium carrionii*. Sin embargo, estos autores encontraron que un aumento en la concentración de este ion inhibió la formación de estas estructuras y promovía el crecimiento vegetativo del hongo. Sekiguchi y Gaucher (1977) reportaron que un aumento de la concentración de este ión no tuvo efecto alguno sobre la conidiación, observando que a menores cantidades se producía mayor número de esporas asexuales, además, este aumento inhibió la producción de metabolitos secundarios de importancia industrial. Sin embargo, existe poca información sobre el efecto de los compuestos de Calcio sobre los procesos fisiológicos y bioquímicos de *Mycosphaerella fijiensis*, lo cual representa un área de oportunidad para investigar.

Las condiciones del cuarto de esporulación son un factor importante para la esporulación ya que fue difícil de mantener regulada la humedad y la temperatura debido a que fueron frecuentes los altibajos de energía eléctrica, esto podría haber afectado la producción de conidios aún para la cepa C1233 (cuadro 16).

El medio de soporte tiene un papel muy importante en los estudios con fragmentos foliares ya que si éstos entran en proceso de senescencia podrían favorecer la infección por el patógeno, de ahí que se usen agentes retardadores. En este estudio se usaron 200 mg/L de Bencimidazol que superan las cantidades aplicadas por Pérez-Vicente *et al.* (2006) y Twizeyimana *et al.* (2007) (40 y 60 mg/L respectivamente), lo cual favoreció que no se observaran daños por senescencia. Esta observación fue reportada previamente por Canché-Gómez (2013) quién observó que usando la misma concentración de Bencimidazol que la usada en este estudio los fragmentos foliares infectados con *M. fijiensis* no presentaron senescencia a los 15 ddi.

En cuanto a la cantidad de conidios inoculada, en este estudio se utilizaron 1,000 conidios/cm<sup>2</sup> observándose, como se detalla más adelante, eventos de penetración a los 5 días. Con respecto a esto, Pérez-Vicente *et al.* (2006) probaron 0, 4, 8, 12, 20 y 40 conidios/cm<sup>2</sup>, encontrando que a la máxima concentración se obtenía un mayor número de lesiones en el mismo lapso de tiempo para el cultivar Gran enano. Ellos afirman que a esta concentración no se presentó antagonismo entre las esporas y que puede corresponder a la cantidad de inóculo presentada en campo como lo reportan Burt *et al.* (1998), quienes encontraron esta concentración de ascosporas en trampas de esporas volumétricas en zonas bananeras de Costa Rica.

Aunque en este estudio se utilizó una concentración 25 veces mayor a la máxima reportada por Pérez-Vicente *et al.* (2006), no se observó algún efecto negativo en los eventos de infección por lo que podríamos pensar que la cantidad inoculada es adecuada para los propósitos del estudio. Además el tiempo o el número de lesiones que un mismo genotipo de banano desarrolle podría depender del aislado de *M. fijiensis* ya que como se sabe, este patógeno se caracteriza por tener una alta tasa de recombinación genética lo que podría dar lugar a cepas con características fenotípicas distintas.

Otro punto a considerar es el estudio de Burt *et al.* (1998), que si bien marca la pauta para saber cuál es la carga de inóculo en condiciones de campo, se debería tomar con ciertas reservas, ya que las condiciones geográficas y ambientales así como la estacionalidad podrían influir en la concentración de esporas, lo cual nos hace pensar que podrían hacerse este tipo de estudios para cada zona afectada con el fin de adecuar las investigaciones a las condiciones de campo.

Con respecto a las observaciones microscópicas, se describió el crecimiento del hongo en los primeros cinco días después de la inoculación, lo cual concuerda en parte con las observaciones realizadas por Peraza-Echeverría *et al.* (2008) quienes reportan un crecimiento similar al mismo tiempo, sin embargo, observaron penetración de estomas a los diez días posteriores a la inoculación de los fragmentos foliares.

Se observaron microscópicamente eventos de infección en los fragmentos foliares pero no se encontró lesión alguna, lo cual pudiera indicar que se trató de la etapa de pizca que concuerda con las observaciones realizadas por Fouré (1985).

Un aspecto a destacar es que como se observó en las fotos y las micrografías los sucesos presentados corresponden en gran medida a la definición de infección temprana realizada por Dean (1997), es decir, se presentaron eventos fisiológicos (germinación de los conidios, desarrollo de hifas y micelio, penetración de los estomas) que nos llevan a pensar que este experimento puede incluirse en los eventos descritos para infección temprana.

**2.5.- BIBLIOGRAFÍA**

- Abadie, C. M.-F. Zapater, L. Pignolet, J. Carlier y X. Mourichon (2008). Artificial inoculation on plants and banana leaf pieces with *Mycosphaerella* spp., responsible for Sigatoka leaf spot diseases. *Fruits*. 63(5), 319-323.
- Alvarado-Capó, Y., M. Leiva-Mora, M. A. Dita-Rodríguez, M. Acosta, M. Cruz, N. Portal, R. Gómez-Kosky, L. García, I. Bermúdez y J. Padrón (2003) Early evaluation of black leaf streak resistance by using mycelial suspensions of *Mycosphaerella fijiensis*, in: *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook. Proceedings of the Workshop on Mycosphaerella Leaf Spot Diseases, San José, Costa Rica, 20–23 May 2002. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier. pp. 169-175.*
- Arraino, L. S., P. A. Brading y J. K. M. Brown (2001). A detached seedling leaf technique to study resistance to *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in wheat. *Plant Pathology*. 50, 339-346.
- Benito, E. P., A. t. Have, J. W. van't Klooster y J. A. L. van Kan (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*. 104, 207-220.
- Biggs, A. R., M. M. El-Kholi, S. El-Neshawy y R. Nickerson (1997). Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilia fruticola*. *Plant disease*. 81(4), 399-403.
- Burt, P. J. A., J. Rutter y F. Ramírez (1998). Airborne spore loads and mesoscale dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain. *Aerobiología*. 14(2-3), 209-214.
- Cavalcante, M. de J. B., J. Escoute, J. P. Madeira, R. E. Romero, M. R. Nicole, L. C. Oliveira, C. Hamelin, M. Lartaud y J. L. Verdeil (2011). Reactive oxygen species and cellular interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and banana. *Tropical Plant Biol.* 4(2), 134-143.

- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the Black Leaf Streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, development and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*. 12(4), 307-328.
- Dean, R. A. (1997). Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 211-234.
- de Gruyter, J., M. P. E. van Gent-Pelzer, J. H. C. Woudenberg, P. C. J. van Rijswijk, E. T. M. Meekes, P. W. Crous y P. J. M. Bonants (2012). The development of a validated real-time (TaqMan) PCR for detection of *Stagonosporopsis andigena* and *S. crystalliniformis* in infected leaves of potato and tomato. *Eur. J. Plant. Pathol.* 134(2), 301-313.
- Donzelli, B.G.G. y A. C. L. Churchill (2007) A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathology*. 97, 916-929.
- El Hadrami, A. (2000) Caractérisation de la résistance partielle des bananiers a la maladie des raies noires et évaluation de la variabilité de l'agressivité de l'agent causal *Mycosphaerella fijiensis*, in Faculté Universitarie des Sciences Agronomiques. Gembloux, Belgique.
- Felsenstein, F. G., R. F. Park y F. J. Zeller (1998). The use of detached seedling leaves of *Triticum aestivum* to study pathogenicity in *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*. *J. Phytopathology*. 146, 115-121.
- Fullerton, R. A. y T. L. Olsen (1995). Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of Black Sigatoka in banana and plantain. *New Zealand Journal of crop and horticultural science*. 23(1), 39-48.
- Jones, D. R. (2000) *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. CABI Publishing. 544 pp.
- Hanada, R.E., L. Gasparotto y J. C. R. Pereira (2002). Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. *Fitopatologia brasileira*. 27, 170-173.

- Hidago, M., A. Tapia, W. Rodríguez y E. Serrano (2006). Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa sp.* AAA, cv. Valery). *Agronomía costarricense*. 30(001), 35-41.
- Hötzel, G. y R. Croome (1999). *A phytoplankton methods manual for australian freshwaters*. Land and Water Resources Research and Development Corporation, Canberra. 58 p.
- Leiva-Mora, M., Y. Alvarado-Capó, M. Acosta-Suárez, M. Cruz-Martín, C. Sánchez-García y B. Roque (2010). Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa spp.* Con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biotecnología vegetal*. 10(2), 79-88.
- Meredith, D. S. y J. S. Lawrence (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society*. 52(3), 459-476.
- Metz, S. P., A. Chandra, A. D. Genovesi y C. F. Campos (2011). Comparison and screening methods to evaluate the response of St. Augustine grass to *Magnaporthe oryzae*. *Plant Pathology*. 61(2), 255-261.
- Mendoza, L., S. M. Karuppayil y P. J. Szanizslo (1993). Calcium regulates *in vitro* dimorphism in chromoblastomycotic fungi. *Mycoses*. 36, 157-164.
- Mourichon, X., D. Peter y M. F. Zapater (1987) Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur des jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*. *Fruits*. 42, 195-198.
- Omolara, M.O. (2008) Detached vs. Attached leaf assays [Forum Online disponible solo en formato caché] Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:k--hsjVkcKwJ:www.commoditiesforum.org/showthread.php%3Ft%3D45+Detached+vs.+Attached+leaf+assays&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=mx> [Acceso 01 de Junio 2012]

- Peraza-Echeverría, L., C. M. Rodríguez-García y D. M. Zapata-Salazar (2008). A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. Australian Plant Pathology. 37, 460-463.
- Pérez-Vicente, L., M. Pérez-Miranda, M. I. Jiménez y M. Jama (2006) Ensayo en fragmentos de hojas de banano y plátanos (*Musa spp.*) para el estudio a nivel monocíclico de la evolución de los síntomas de la Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Fitosanidad. 10(1), 3-9.
- Person, C., D. J. Samborski y F. R. Forsyth (1957). Effect of Benzimidazole on detached wheat leaves. Nature. 180(4597), 1294-1295.
- Puc-Ceh, M. A. (2001). Evaluación de la actividad fitotóxica en cultivos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet mediante el uso de diferentes técnicas de bioensayo. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Reglinski, T., G. D. Lyon y A. C. Newton (1995). The control of *Botrytis cinerea* and *Rhizoctonia solani* on lettuce using elicitors extracted from yeast cell walls. Journal of Plant Diseases and Protection. 102, 257-266.
- Rodríguez-García, C. M., R. Z. Navarrete-Mapen y L. Peraza-Echeverría (2007). Characterisation of the *in vitro* conidial morphology of *Mycosphaerella fijiensis*, a major pathogen of banana. Australian Plant Pathology. 36, 369-372.
- Rodríguez-Gaviria, P. A. y G. Cayón (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja del plátano. Agronomía colombiana. 26(2), 256-265.
- Sekiguchi, J. y G. M. Gaucher (1977). Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*. Appl. Environ. Microbiol. 33(1), 147-158.
- Sepúlveda, L., L. E. Vásquez, C. I. Paniagua, D. Echeverry, C. A. Hernández, E. Rodríguez, L. F. Restrepo y R. Arango (2009). The presence and spectrum of light influences the *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis* causal agent of black Sigatoka. 38, 514-517.

Sigma-Aldrich, 2012. Benzimidazoles. Product directory. [Online] Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemistry-products.html?TablePage=16266009>. [Acceso 05 de Noviembre del 2012]

Sigma-Aldrich, 2012. Gibberellic acid. Product directory. [Online] Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7645?lang=es&region=MX>. [Acceso 05 de Noviembre del 2012]

Singh, N. y D. Mishra (1975). The effect of Benzimidazole and red light on the senescence of detached leaves of *Oryza sativa* cv. Ratna. *Physiol. Plant.* 34, 67-74.

Townley, A., J. Foundling, M. Corsten y N. A. Pain (2001) *Mycosphaerella fijiensis* disease development in leaves on whole plants and in a detached leaf assay. Caribbean Division Meeting of the American Phytopathological Society.

Twizeyimana, M., P. S. Ojiambo, A. Tenkouano, T. Ikotun y R. Bandyopadhyay (2007) Rapid screening of *Musa* species resistance to black leaf streak using *in vitro* plantlets and detached leaves. *Plant Dis.* 91, 308-314.

Yarwood, C. E. (1946). Detached leaf culture. *The botanical review.* 12(1), 1-56.

---

## CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA SUSTRÁIDA DE LA INTERACCIÓN TEMPRANA ENTRE *Mycosphaerella fijiensis* Y *Musa acuminata* cv. Gran Enano EN CONDICIONES *in vitro*

### 3.1.- INTRODUCCIÓN

Los procesos metabólicos y celulares que regulan las actividades de los seres vivos se encuentran bajo el control de la expresión de genes involucrados en dichos procesos. Diversas condiciones ambientales y/o procesos patológicos producen cambios en los patrones de expresión de las células como respuesta a estas situaciones (Lewin *et al.*, 2011). En eucariotas superiores se ha reportado que 15% de los genes (aproximadamente 15, 000 ARNm) se expresan sólo durante cierto estado fisiológico (Wang y Lu, 1998 citados por Huang *et al.*, 2007). La identificación de los genes que se expresan bajo estas condiciones (expresión diferencial) permite obtener un mayor conocimiento sobre los procesos moleculares involucrados durante el desarrollo de la respuesta de los organismos ante las condiciones antes expuestas (Wan *et al.*, 2002).

#### 3.1.1.- Expresión diferencial

Según Distler *et al.* (2007) este término incluye a aquellas técnicas que pueden ser utilizadas para analizar una gran cantidad de genes que se expresan o se inhiben bajo ciertas condiciones, entre ellas podemos encontrar las siguientes:

- Microarreglos
- Análisis serial de la expresión génica (SAGE)
- Despliegue diferencial
- **Hibridación sustractiva por supresión**

En esta última metodología está basado el presente trabajo sin embargo, casi todas las técnicas poseen pasos en común como la extracción de ARN total o la síntesis de ADN complementario (ADNc), los cuales se explican a continuación.

#### 3.1.2.- Extracción de ARN total

El estudio de la expresión diferencial de genes con las técnicas antes mencionadas inicia con la extracción del ARN, el cual es la forma química en la cual los

genes transcriben la información contenida en ellos, dependiendo de la sensibilidad de la técnica y los reactivos con los que se trabaje, se puede iniciar con el ARN total (el cual contiene ARN ribosomal, de transferencia, nucleares pequeños, mensajero, entre otros) o directamente con el ARN mensajero, el cual es el tipo que posee la información codificada en los genes para la síntesis de las proteínas (Farrell, 2009).

Las células vegetales y fúngicas son similares a las células animales ya que también se encuentran divididas interiormente por membranas pero a diferencia de éstas poseen una pared celular rica en carbohidratos, compuestos fenólicos y proteínas que reaccionan o contaminan el ARN (Slater, 1983), además de estos componentes, la susceptibilidad de este material al ataque por ARNasas y la contaminación con ADN o melanina son factores que dificultan su extracción (Farrell, 2009; Islas-Flores, 2006).

Para evitar estos inconvenientes se han diseñado distintos métodos que permiten extraer ARN total en cantidad y calidad suficientes para su uso en diferentes técnicas como Northern blot, síntesis de ADNc, entre otras. Estos métodos de extracción se basan en el uso de determinados reactivos y principios fisicoquímicos que aprovechan las propiedades del ARN para evitar la degradación y contaminación del mismo, en el cuadro 17 se mencionan algunos de estos reactivos usados en este estudio y su influencia en la eficiencia de la extracción.

### **3.1.3.- Síntesis de ADN complementario (ADNc) por la técnica SMARTer™.**

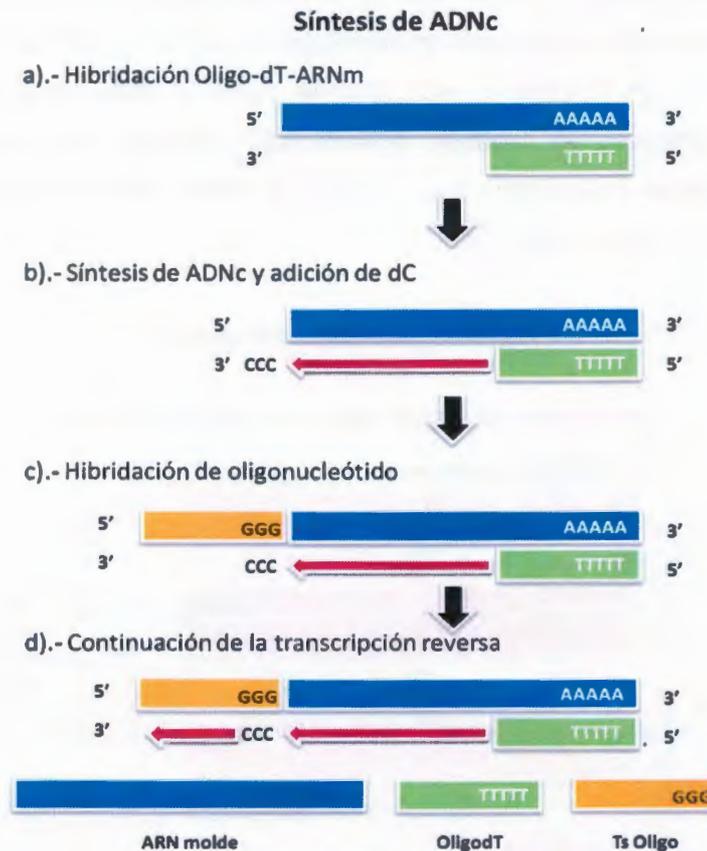
Uno de los principales problemas de algunos métodos de síntesis de ADNc es la baja representación de los extremos 5' especialmente para aquellos genes de una longitud mayor a 2 kb, esto es debido a que durante la transcripción reversa el proceso termina prematuramente justo antes de llegar al extremo antes mencionado, con lo cual los fragmentos resultantes poseen una longitud menor a la esperada (Zhu *et al.*, 2001).

Para solucionar esta problemática varios métodos han sido diseñados entre ellos CAPture y CAP-trapping (Carninci *et al.*, 1996 y Edery *et al.*, 1995 citados por Zhu *et al.*, 2001) sin embargo, requieren demasiados pasos intermedios lo cual dificulta la obtención de los fragmentos de secuencia completa, además necesitan una gran cantidad de material inicial (alrededor de 20-100 µg de ARNm) y presentan alta probabilidad de contaminación (Zhu *et al.*, 2001).

**Cuadro 17.-** Reactivos empleados en las técnicas de extracción de ARN de este trabajo y su efecto en las mismas.

Reactivo	Función en la extracción de ARN	Referencia
PVP	Unión a compuestos fenólicos, evitando que estos oxiden el ARN o se unan a él interfiriendo en operaciones posteriores.	Loomis, 1974.
Fenol	Desproteínización de muestras	Slater, 1983.
SDS	Desnaturalización de ribonucleasas	Slater, 1983.
B-Mercaptoetanol	Ruptura de los enlaces disulfuro de las proteínas	Farrell, 2009.
Alcohol isoamílico	Evita la formación de espuma y extrae algunos grupos de proteínas y carbohidratos	Zumbo, 2012
LiCl	Precipita preferentemente con ARN en mezclas de ácidos nucleicos.	Barlow <i>et al.</i> 1963.
Cloroformo	En mezcla con fenol ayuda a la desproteínización de la muestra	Tan y Yiap, 2009.

En el 2001, Zhu y colaboradores publicaron el desarrollo de un nuevo método para la obtención de ADNc completo denominado SMART (Switching Mechanism At 5' End of RNA Transcript), este método se basa en la construcción de la cadena complementaria a la secuencia de ARNm a partir de un iniciador que hibrida con la cola de Poli A, una vez que la enzima (Transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina) ha llegado al extremo 5' de la cadena de ARNm molde, la actividad transferasa terminal agrega a la cadena naciente un grupo de nucleótidos, preferentemente deoxicitosina. Esto hace que pueda hibridarse con un oligonucleótido que posee deoxiguaninas con lo cual se da el cambio de templado y la enzima continua la transcripción tomando como molde este oligonucleótido (ver figura 14).



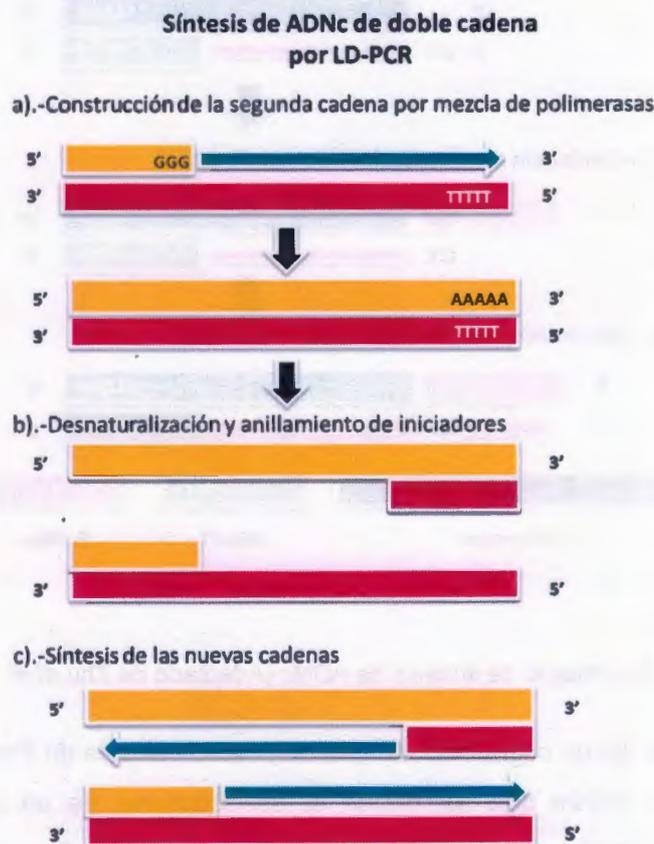
**Figura 14.-** Proceso de síntesis de ADNc (Adaptado de Zhu *et al.*, 2001).

Debido al uso de un oligonucleótido que hibrida con la cola de Poli A, se obtienen la mayor parte de los ARNm que componen el transcriptoma de un individuo, aquellos transcritos que no posean esta modificación (como los transcritos que codifican para histonas), transcritos terminados prematuramente, así como secuencias de ADN genómico no serán amplificadas por este método (Clontech, 2010).

### 3.1.3.1.- Síntesis de ADNc de doble cadena.

Una vez sintetizado el ADNc de una cadena por el método SMART™ es posible sintetizar la segunda cadena a través de una PCR de larga distancia o LD-PCR (por sus siglas en inglés de *Long-Distance PCR*) (ver figura 15).

Durante este proceso un paso clave es la determinación del ciclo de amplificación óptimo en el cual se tenga al material en fase exponencial de amplificación, ya que si se necesita el ADNc para posteriores aplicaciones como la construcción de bibliotecas sustraídas por supresión, un producto sobreciclado resultará en una prueba menos representativa mientras que por otro lado, el tener un menor ciclado resultará en menores rendimientos de ADNc (Clontech, 2010).



**Figura 15.- Síntesis de ADNc de doble cadena.**

Para la síntesis de ADNc de doble cadena es necesario una polimerasa de alta fidelidad que asegure la menor cantidad de errores, en años recientes se ha comprobado que la combinación de una polimerasa de alta fidelidad con una que posea actividad correctora favorece una mejor síntesis de ADNc (Clontech, 2009).

### **3.1.3.1.1.- Mezcla de polimerasas Advantage® cDNA**

Esta mezcla de polimerasas está compuesta por la polimerasa TITANIUM™ o más recientemente por la polimerasa KlenTaq-1 (ambas son una modificación de la Taq polimerasa convencional por eliminación de su extremo N terminal), una polimerasa con actividad de corrección 3'-5' y un anticuerpo "Hotstart"; lo cual en conjunto permite amplificaciones con mayor fidelidad, mayor rendimiento y más eficientes, además de lograrse en una menor cantidad de ciclos (Clontech, 2009).

Estas enzimas tienen la capacidad de soportar una gran variedad de condiciones, como la variación en la concentración de  $Mg^{2+}$ , lo que representa una gran mejora frente a otras polimerasas. El uso de un sistema doble (una polimerasa principal y otra con actividad de corrección) ha sido documentado como un factor positivo en la amplificación de diversos segmentos de ADN, entre otras, por las siguientes ventajas (Clontech, 2009):

- Incremento del rango: El límite máximo para una PCR convencional es de alrededor de 3 kb mientras que con este sistema es posible llegar hasta los 40 kb (dependiendo del diseño de los iniciadores, el molde y otras variables).
- Incremento de la precisión: La inclusión de una cantidad menor de una polimerasa con actividad de corrección resulta en una tasa de error significativamente menor que en una PCR convencional usando solamente la Taq polimerasa.
- Incremento de la eficiencia y mayores rendimientos: El uso de un sistema doble de polimerasas incrementa el rendimiento, la eficiencia y la sensibilidad de los amplicones, inclusive para aquellos destinados a una PCR convencional, algo que no ofrecen otras enzimas destinadas a estas aplicaciones.

El sistema "Hotstart" se refiere al método para "bloquear" física o funcionalmente un componente del sistema de PCR hasta que se inicien los ciclos térmicos. Este método ha mostrado mejorar la eficiencia y la especificidad de la reacción al reducir o eliminar la síntesis de ADN inespecífica y evitar la formación de dímeros de iniciadores que comúnmente aparecen antes del establecimiento de las temperaturas de reacción. El anticuerpo reconoce polimerasas Taq así como también aquellas modificadas en su extremo N terminal como las enzimas TITANIUM™ y Klen Taq-1. Una vez que se han establecido los ciclos térmicos de la PCR la actividad polimerasa es restablecida ya que

este anticuerpo se desnaturaliza a temperaturas mayores a 70°C, por lo que la pérdida de la inhibición de la actividad es completa e irreversible (Clontech, 2009). Además de este sistema existen otros que también evitan la actividad polimerasa inespecífica sin embargo, el anticuerpo “Hotstart” tiene la ventaja de no requerir pasos adicionales después de la desnaturalización con lo cual se reduce en gran medida la contaminación de la mezcla de reacción (Clontech, 2009).

#### **3.1.4.- Principio de la Hibridación Sustractiva por Supresión (HSS)**

Como se mencionó en el primer capítulo, la HSS es una técnica con la cual se pueden obtener secuencias de genes que hayan sido expresados diferencialmente; a diferencia de la Hibridación sustractiva convencional, la HSS requiere un menor número de pasos y, contrario a otras técnicas que trabajan con ADNc, permite recuperar secuencias de genes que se expresan a bajo nivel (Distler *et al.*, 2007). A continuación se irán detallando cada uno de los pasos que involucran la construcción de una biblioteca HSS.

##### **3.1.4.1.- Digestión**

El ADNc se digiere con Rsa I, esta enzima es utilizada debido a dos principales características: primeramente porque durante el corte genera fragmentos con bordes romos y además la longitud de los mismos (600 pb dependiendo de la muestra) es óptima para el desarrollo de la técnica. El fragmentar el ADNc presenta la ventaja de que evita que se formen redes complejas entre los fragmentos las cuales no permiten que se generen los híbridos adecuados para los siguientes pasos del proceso. También se ha observado que moléculas pequeñas proveen suficiente información para representar a un gen, ya que fragmentos más largos podrían presentar homología en algunas secciones lo que en el momento de la sustracción evitaría que permanezcan como una cadena, con lo cual se perdería la correspondiente información (Lukyanov *et al.*, 2007).

##### **3.1.4.2.- Ligación**

El tester es dividido en 2 porciones, cada una de las cuales se liga a un adaptador de secuencia conocida, los extremos de estos adaptadores no poseen grupos fosfato en

su extremo 5' de tal manera que sólo pueden unirse a los fragmentos resultantes de la digestión a través de su extremo 3' (Clontech, 2007; Diatchenko *et al.*, 1999).

#### 3.1.4.3.- Normalización y sustracción

Durante la construcción de bibliotecas de ADNc (como en el caso de la HSS), uno de los principales retos a los que se enfrentaban los investigadores era cómo reducir la proporción de transcritos que se expresaban abundantemente y a la vez, mantener la diversidad de la muestra; esto se logró gracias a la normalización de las bibliotecas, procedimiento en el cual, a través de pasos sucesivos de hibridación, se lograban estos objetivos y a la vez se obtenían muestras con una gran cantidad de secuencias. Este proceso se basa en la cinética de segundo orden de la reasociación de los ácidos nucleicos, es decir, aquellos transcritos que se encuentren en mayor concentración se reasociarán con mayor rapidez que aquellos que sean menos abundantes (Chen, 2003).

Durante la primera hibridación del tester con el driver la normalización ocurre debido al alineamiento de secuencias homohíbridas (tester-tester o driver-driver) y heterohíbridas (tester-driver), esto enriquece la muestra en transcritos expresados diferencialmente (Clontech, 2007; Lukyanov *et al.*, 2007). Una vez finalizada la primera hibridación se procede a realizar una segunda ronda donde sólo aquellas secuencias que permanecen como cadena simple son capaces de reasociarse y formar las especies b, c y e de la figura 3. En la práctica, no todos los transcritos son sustraídos efectivamente ya que el nivel de enriquecimiento de un gen en particular está dado por diversos factores, tales como la abundancia original del mismo, el número y abundancia de otros genes expresados diferencialmente, entre otros (Lukyanov *et al.*, 2007).

El nuevo exceso de driver aumenta el grado de hibridación con lo cual se enriquece la fracción e. Durante el primer ciclo de PCR se rellenan los extremos de los adaptadores, creándose los sitios para las posteriores amplificaciones, las fracciones a (tester no hibridado) y d (driver en forma de cadena simple y doble) no poseen sitios de unión de cebadores y la fracción c (tester hibridado con otra cadena que posee el mismo adaptador) sólo puede ser amplificada de manera lineal (no exponencial), la fracción b entre cada ciclo de desnaturalización y alineamiento forma estructuras tipo horquilla que evitan su amplificación (efecto de supresión) (Diatchenko, 1999).

#### 3.1.4.4.- Amplificación por PCR y PCR anidada

Después de la sustracción, la biblioteca de ADNcc es sometida a dos reacciones de PCR las cuales amplifican exponencialmente las secuencias expresadas diferencialmente. De acuerdo al esquema de la figura 4, sólo las moléculas e son amplificadas durante la primer PCR debido a que poseen los sitios de alineamiento para los iniciadores, mientras que las otras moléculas no los poseen (a y d), poseen sólo un sitio (c) ó forman estructuras tipo horquilla que no permiten su amplificación (Clontech, 2007; Distler *et al.*, 2007; Diatchenko *et al.*, 1996). Después de terminada la primera PCR se inicia una segunda con iniciadores anidados los cuáles reducen la concentración de otros productos de PCR que no son de interés y enriquecen a la vez aquellos expresados diferencialmente (Wan *et al.*, 2002; Diatchenko *et al.*, 1999).

#### 3.1.5.- Limitaciones de la Hibridación sustractiva por supresión

A pesar de las claras ventajas de este método, la HSS ha probado también tener algunas limitaciones, por ejemplo cuando existen pocos genes que son expresados diferencialmente en la muestra tester y/o estos presentan una diferencia cuantitativa menor en su expresión con respecto al driver cabe la posibilidad de que se obtenga un gran ruido de fondo, es decir, que en las clonas se presenten muchas secuencias que estén relacionadas con genes que debieron ser sustraídos, aún cuando el enriquecimiento para genes expresados diferencialmente haya sido adecuado (Lukyanov *et al.*, 2007). Esto puede dificultar e incrementar los costos ya que en este caso se tendrían que secuenciar un mayor número de clonas para encontrar genes de interés (Lukyanov *et al.*, 2007).

### 3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para la extracción de ARN total a partir de fragmentos foliares infectados de *Musa acuminata* cv. Gran Enano y fragmentos foliares del mismo cultivar mantenidos en condiciones control se utilizó el protocolo de Rodríguez-García *et al.* (2010). Para la extracción de ARN total de conidios y micelio de *Mycosphaerella fijiensis* cepa C1233 se utilizó el protocolo de Islas-Flores (2006). Una vez extraído el ARN total se procedió a su cuantificación usando un equipo Nano-drop 2000 y se checó su integridad usando geles de agarosa al 1.2%.

Las muestras de ARN total se agruparon en pares, para el driver se realizaron 3 síntesis correspondientes a los pares 0 y 3 ddi, 5 y 10 ddi y ARN total de conidios-micelio. En el caso del tester los pares de muestras correspondieron a 0 y 3 ddi y 5 y 10 ddi. La síntesis del ADNc se realizó a partir de 2 µg de las mismas usando el protocolo SMARTer™ modificado, los iniciadores del kit se cambiaron por los diseñados por Prentis *et al.* (2010) (Cuadro 18), los cuales incluyen el sitio de reconocimiento de la enzima Mme I (ver figura 16); para obtener el ADNc se realizaron pruebas de ciclos óptimos para determinar el ciclo más adecuado de amplificación, los productos de la síntesis fueron observados en geles de agarosa al 1.2%.

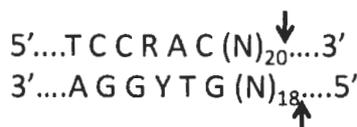


Figura 16.- Sitio corte de la enzima Mme I (tomado de New England Biolabs)

Después se procedió a la purificación de ADNc sintetizado usando el QIAquick PCR purification kit (QIAGEN, 2008), para luego realizar pruebas con distintos pares de iniciadores que amplifican los genes de *MfActina*, *MfAvr4* y *MaCox1* (diseñados por la Dra. Blondy Canto) con el fin de elegir el o los adecuados para las pruebas de ligación. Las amplificaciones se realizaron con los siguientes programas: 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C 30 s y 72 °C 1 min y un período de extensión de 5 min a 72 °C para los genes *MfActina* y *MfAvr4* (dos pares de iniciadores), y 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 60 °C 45 s y 72 °C 40 s y un período de extensión de 8 min a 72 °C para el gen *MaCox1*.

Cuadro 18.- Secuencia de los iniciadores diseñados por Prentis *et al.* (2010).

Iniciador	Secuencia 5'-3'
Trsa Mme I primer	CGCAGTCGGTACTCCAAC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTIVN
TS Oligo primer	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCRGRGRG
Trsa Mme I PCR	CGCAGTCGGTACTCCAAC TT
TS PCR	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG T

Una vez elegido el par de iniciadores con el cual se analizó la ligación se procedió a la doble digestión usando las enzimas Rsa I (corte romo ver figura 17) y Mme I (corte cohesivo) de acuerdo a las especificaciones del Dr. R Skye (comunicación personal) y nuevamente se purificó usando el kit QIAquick para después precipitar y concentrar los productos digeridos usando el protocolo de SMART<sup>er</sup> (Clontech, 2010), los productos de las purificaciones, digestiones y concentraciones se analizaron usando geles de agarosa al 1.2%.



**Figura 17.-** Sitio de corte de la enzima Rsa I (tomado de New England Biolabs).

Después de estas operaciones se procedió a mezclar los componentes del driver en proporción 4:1 hongo-planta de acuerdo a Carpenter *et al.* (2005), además se preparó muestra driver control a partir de ARN total de placenta y tester control mezclando el ADNc obtenido a partir del mismo con ADN del virus  $\phi$ X174 digerido con enzima Hae III, para después dividir ambos tester en dos partes según el protocolo de Clontech (2007) y posteriormente ligarlo a los adaptadores del kit de acuerdo a las especificaciones del mismo.

Una vez ligados los adaptadores al tester se procedió a realizar un análisis de ligación tanto del tester control como del tester experimental, amplificando los genes *G3DPH* (control) y *MfActina* (tester experimental), el primero de acuerdo a las especificaciones del kit y el segundo con el siguiente programa de PCR: 75 °C por 5 min, 95 °C por 3 min y 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s con un tiempo de extensión de 5 min a 72 °C. De acuerdo a lo contemplado por Clontech (2007) los amplicones que contengan los adaptadores ligados adecuadamente mostrarán un peso molecular mayor al de aquellos que no los contengan, así como también una intensidad ligeramente menor ya que eso evidenciaría la eficiencia de ligación de los adaptadores, una intensidad similar significa que la ligación se realizó eficientemente.

Después de la prueba de eficiencia de ligación se procedió a realizar la primer hibridación tanto de la muestra control como experimental, mezclando una porción del

driver con cada uno de los tester ligados en bufer de hibridación, para ser calentados a 98 °C por 1.5 min y después a 68 °C por 8 h aproximadamente. Posteriormente se procedió a añadir más driver desnaturalizado el cual se mezcló con ambas porciones hibridadas y se incubó a 68 °C nuevamente por un período similar al anterior. Cabe destacar que un tratamiento similar se aplicó a muestras de tester no hibridado (tanto control como experimental).

Una vez hibridadas las muestras se procedió a amplificar aquellos genes que se expresaron diferencialmente usando el PCR Primer 1 (en la primera amplificación) y posteriormente a través de una PCR anidada usando los iniciadores Nested PCR Primer 1 y 2 con las condiciones especificadas por Clontech (2007), de la primera y segunda amplificación, tanto de la biblioteca sustraída como del tester no sustraído (tanto control como experimental) se tomaron alícuotas las cuáles fueron analizadas en un gel de electroforesis de agarosa al 2%.

Para verificar la eficiencia de la sustracción se realizaron amplificaciones de los genes *G3DPH* (control) y *MfActina* (experimental) tanto a las muestras sustraídas como a las no sustraídas usando el siguiente programa de PCR: 18 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 68 °C por 30 s, después de los cuáles se tomó una alícuota y se repitieron las condiciones anteriores pero ahora por 5 ciclos y así continuamente hasta llegar hasta 33 ciclos, para luego analizar los productos de PCR en un gel de electroforesis de agarosa al 2.0 %.

Debido a que una de las limitantes para usar la HSS en secuenciación masiva por el sistema Roche/454 es la falta de grupos fosfato en su extremo 5', se decidió fosforilar la biblioteca sustraída con la enzima T4 Cinasa, la cual fue donada amablemente por la doctora Luisa López Ochoa. Para verificar su actividad se realizó una prueba usando el plásmido pBNR-lib el cual fue digerido con la enzima EcoRI por 4 h a 37 °C, después se purificó usando el kit QIAquick (QIAGEN Inc.), posteriormente fue defosforilado con Fosfatasa alcalina por 1 h a 37 °C para luego volver a fosforilarlo con la T4 Cinasa por 30 min a 37 °C. Una vez que teóricamente fueron repuestos los fosfatos de los extremos 5' el vector linealizado se ligó con la enzima T4 ADN Ligasa por 12 h a 16 °C, la ligación se consideró efectiva cuando el vector mostró una movilidad electroforética similar a la que tenía antes de los tratamientos mencionados. Para descartar cualquier otro efecto se

anexó un control negativo el cual consistió en el vector no fosforilado sometido al tratamiento de ligación, el cual no podría volver a recircularse por la falta de fosfatos en los extremos 5'. Una vez comprobado el funcionamiento de la T4 Cinasa se fosforiló la biblioteca sustraída usando las condiciones antes mencionadas, se purificó con el kit QIAquick y se verificó su concentración utilizando el equipo Nanodrop 2000.

### 3.3.- RESULTADOS

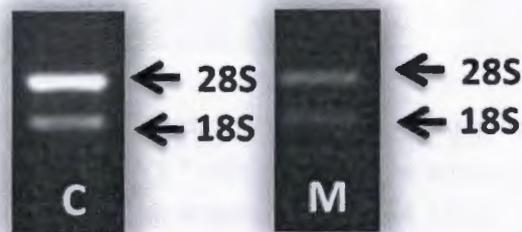
Se aisló y purificó el ARN total de los fragmentos foliares control, conidios y micelio de *M. fijiensis* (elementos del driver) y fragmentos foliares infectados (tester) al cual se le determinó su pureza, los resultados se muestran en el cuadro 19. Como se puede observar, en todas las extracciones se obtuvo material con poca contaminación tanto de proteínas como de fenoles y carbohidratos, la integridad del mismo se determinó por corrimiento en gel, el cual se observa en las figuras 18 y 19. En ambas se muestra el patrón característico del ARN total con las bandas de las subunidades ribosomales 28S y 18S, la intensidad de las bandas en gel se relaciona con la cantidad de ARN total determinada espectrofotométricamente que en algunas muestras fue mayor que en otras.

**Cuadro 19.-** Comparación de la concentración y pureza de ARN total extraído de fragmentos foliares.

	ARN total de fragmentos foliares	ARN total de micelio	ARN total de conidios
<b>Concentración</b>	73.9-128.4 µg/gpf	24.6 µg	39.2 µg
<b>260/280 (1.8-2.0)</b>	2.0	2.1	2.0
<b>260/230 (2.0-2.2)</b>	2.0	2.2	1.9



**Figura 18.-** ARN total extraído de fragmentos foliares control de 0, 3, 5 y 10 días (carriles 1, 3, 5 y 7) y de fragmentos foliares infectados de 0, 3, 5 y 10 días (carriles 2, 4, 6 y 8).



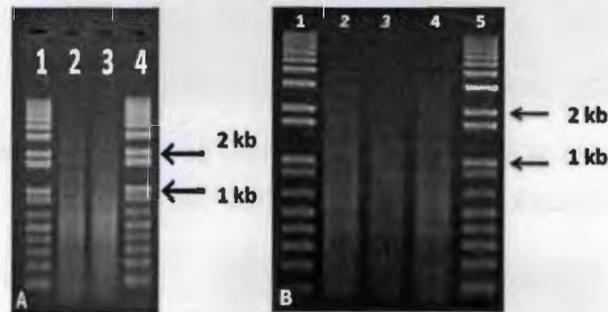
**Figura 19.-** ARN total extraído de conidios (C) y micelio (M).

El ARN total (2 µg) fue tratado con ADNasa por 15 min a temperatura ambiente para degradar cualquier resto de ADN que pudiera contaminar la síntesis de ADNc. Posteriormente se procedió a la síntesis de la primera cadena con los elementos del driver y del tester. Cabe recalcar que para las mezclas de ARN total se combinaron volúmenes equivalentes de cada muestra para obtener los 2 µg mencionados.

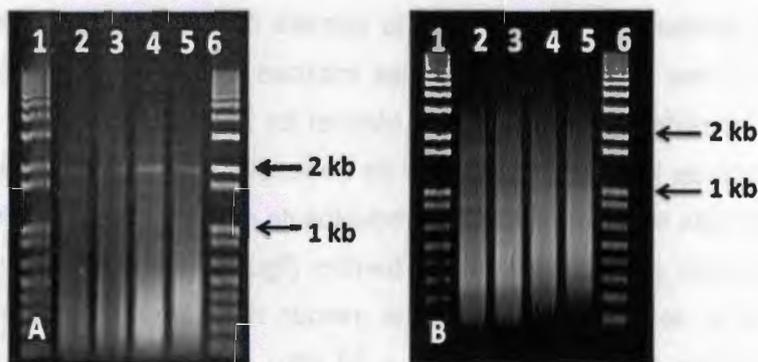
Los productos de la síntesis de ADNc de cadena sencilla presentaban tamaños desde 100 pb hasta más de 5 kb, siendo los productos de menor tamaño (< 2 kb) los más abundantes de acuerdo a la intensidad del barrido (figura 20). Con este material se procedió a obtener la segunda cadena por el método de la PCR de larga distancia, obteniéndose un barrido similar al de la figura 20 pero con mayor intensidad y no se observaron señales de concatamerización. Como ciclos óptimos se eligieron 21 para fragmentos foliares control y 19 para material de conidios-micelio; esto se logró modificando las condiciones del protocolo original por las mencionadas en el cuadro 20.

Al momento de la síntesis del ADNc de doble cadena del tester se renovó el kit enzimático por lo que las condiciones de síntesis cambiaron a las que se presentan en el

cuadro 21. Sin embargo, esto no afectó la síntesis del material, obteniéndose un barrido superior a los 2 kb que se concentraba en aquellos productos menores a 1 kb, mostrando un bandeo definido en esta área (figura 22).



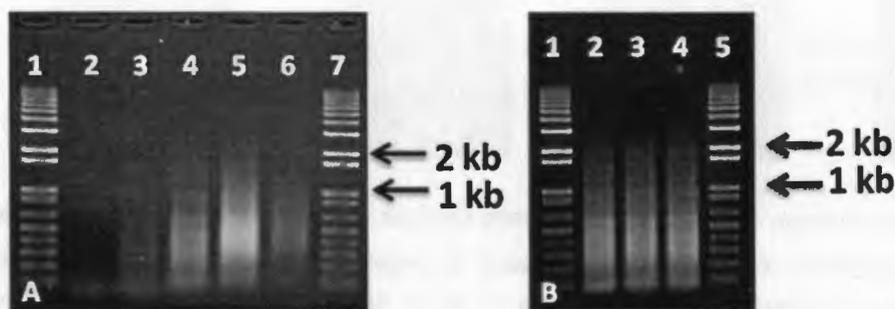
**Figura 20.-** ADNc de una cadena de fragmentos foliares infectados (A) y mezcla de material fúngico y fragmentos foliares control (B). Carriles 1 y 4 (A) y 1 y 5 (B): Marcador de peso molecular 1 kb plus. Carriles 2 y 3 (A): ADNc de una cadena de fragmentos foliares infectados de 0 y 3 ddi y 5 y 10 ddi respectivamente. Carril 2 (B): ADNc de una cadena de mezcla de conidios y micelio de *M. fijiensis*. Carriles 3 y 4 (B): ADNc de una cadena de fragmentos foliares control de 0 y 3 ddi y 5 y 10 ddi respectivamente.



**Figura 21.-** Prueba de ciclos óptimos para la síntesis de ADNc de doble cadena de mezcla de conidios-micelio (A) (19 ciclos) y fragmentos foliares control (B) (21 ciclos).

**Cuadro 20.-** Modificaciones al protocolo de síntesis de ADNc de doble cadena Advantage 2 para muestras de fragmentos foliares control y mezcla de conidios y micelio.

Factor	Protocolo Advantage 2	Protocolo modificado
Desnaturalización	95°C/1 min	96°C/1 min
Anillamiento	65°C/30 s	60°C/1 min
Extensión	68°C/3-6 min	68°C/3min
Ciclo óptimo	18-21	21 para fragmentos foliares control y 19 para conidios y micelio

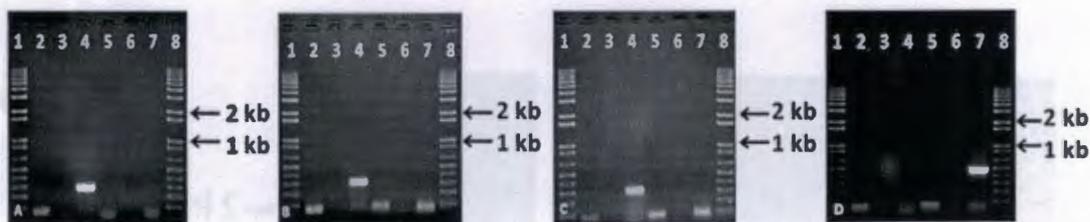


**Figura 22.-** Síntesis de ADNc de doble cadena del tester. Prueba de ciclos óptimos (A) y Síntesis a 22 ciclos (B). Carriles 1 y 7 (A) y 1 y 5 (B): Marcadores de peso molecular de 1 kb Plus. Carriles 2-6 (A): Síntesis de ADNc de doble cadena a 15, 18, 21, 24 y 27 ciclos. Carriles 2-4 (B): Síntesis de ADNc de doble cadena del tester a 22 ciclos.

**Cuadro 21.-** Modificaciones al protocolo de síntesis de ADNc de doble cadena Advantage 2 para muestra tester.

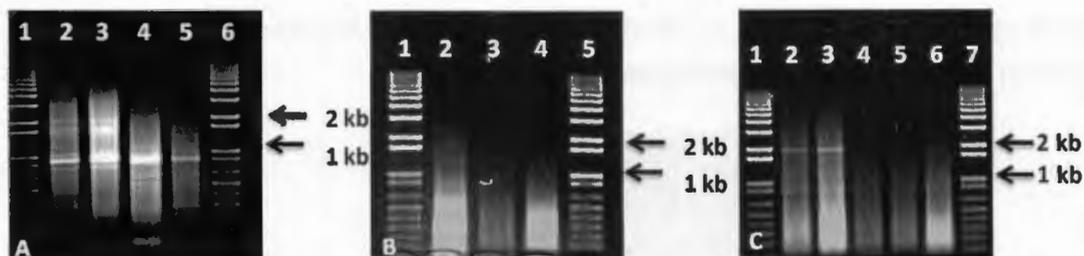
Factor	Protocolo Advantage 2	Protocolo modificado
Desnaturalización	95 °C/1 min	96 °C/1 min
Anillamiento	65 °C/30 s	60 °C/1 min
Extensión	68 °C/3-6 min	68 °C/2 min
Ciclo óptimo	18-21	21

Antes de continuar con las operaciones de digestión enzimática, purificación y concentración del ADNc sintetizado se probaron distintos pares de iniciadores para elegir cuál se utilizaría en el análisis de eficiencia de ligación. Los cuatro pares amplificaron de acuerdo a lo esperado, mostrando que a las condiciones especificadas se sintetizaba el amplicón solamente en el material del organismo para el cual fueron diseñados (figura 23). Ya que el fin último de la biblioteca sustractiva es obtener secuencias del patógeno, se decidió usar el par de iniciadores del gen de Actina de *M. fijiensis*.



**Figura 23.-** Amplificación de fragmentos de genes fúngicos y vegetales: (A) Amplificación de gen de Actina de *M. fijiensis* (carril 4). (B) Amplificación de fragmento de *Avr4* de *M. fijiensis* (carril 4). (C) Amplificación de segundo fragmento de *Avr4* de *M. fijiensis* (carril 4). (D) Amplificación de fragmento de *Cox1* de *Musa acuminata* (carril 7). Carriles 1 y 8 (A-D): Marcadores de peso molecular 1 kb plus. Carriles 2 y 5 (A-D): Control negativo sin ADNc molde. Carriles 3 y 6 (A-D): Control negativo con ADNc molde sin iniciadores.

Posteriormente durante las operaciones de purificación no se observó degradación del material. En la digestión enzimática doble (Mme I con Rsa I) se observó una disminución considerable del barrido, aún mayor a la presentada por el driver control (figura 24). Durante la concentración del ADNc tampoco se observó degradación, y se obtuvo la concentración necesaria para continuar con la ligación del tester ( $\geq 300$  ng/ $\mu$ L).



**Figura 24.-** Digestión, purificación y concentración del ADNc del driver control (A), tester experimental (B) y driver experimental (C). Carriles 1 y 6 (A), 1 y 5 (B) y 1 y 7 (C): Marcador de peso molecular 1 kb plus. Carril 2 (A): ADNc control. Carril 3 (A): ADNc purificado. Carril 4 (A): ADNc digerido con *Rsa* I. Carril 5 (A): ADNc purificado. Carril 2 (B): ADNc tester purificado. Carril 3 (B): ADNc digerido con *Mme* I y *Rsa* I. Carril 4 (B): ADNc concentrado. Carril 2 (C): ADNc tester sin purificar. Carril 3 (C): ADNc purificado. Carril 4 (C): ADNc digerido con *Mme* I y *Rsa* I. Carril 5 (C): ADNc purificado. Carril (6): ADNc concentrado.

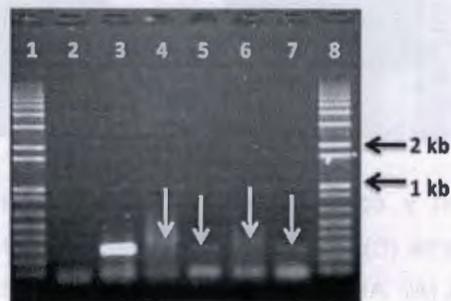
Después de la ligación se analizó la eficiencia de la reacción en el tester control amplificando el gen *G3DPH*. En la figura 25 se observa que los amplicones que contenían los adaptadores eran ligeramente menos intensos y de mayor tamaño que aquellos que no los contenían, con lo cual se concluyó que la ligación se había llevado adecuadamente.



**Figura 25.-** Análisis de ligación del tester control usando iniciadores que amplifican el gen *G3DPH*. Carriles 1 y 7: Marcador de peso molecular 1 kb plus. Carril 2: Control negativo sin ADN molde. Carriles 3 y 5: Amplificación de fragmentos del gen *G3DPH* conteniendo los adaptadores 1 y 2R respectivamente. Carriles 4 y 6: Amplificación de fragmentos del gen *G3DPH* sin adaptadores.

En el caso del tester experimental se obtuvieron bandas de tamaño ligeramente superior a las de los amplicones sin adaptadores, así como también una banda de tamaño

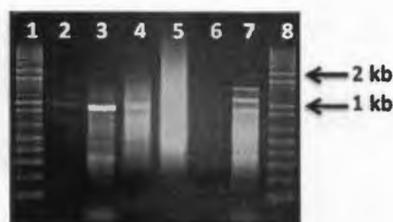
similar, sin embargo presentaron un barrido que no permitió distinguir con claridad la intensidad de las bandas para su comparación (figura 26).



**Figura 26.-** Análisis de ligación del tester experimental usando iniciadores que amplifican el gen de Actina de *M. fijiensis*. Carriles 1 y 8: Marcadores de peso moelcular 1 kb plus. Carril 2: Control negativo sin ADN molde. Carril 3: Control positivo. Carriles 4 y 6: Amplificación de fragmentos del gen de Actina conteniendo adaptadores 1 y 2R respectivamente. Carriles 5 y 7: Amplificación de fragmentos del gen de Actina sin adaptadores.

Una vez ligados tanto el tester control como el experimental se procedió a realizar la sustracción de cada muestra de acuerdo a lo especificado en el manual del kit; posteriormente se realizaron ampliificaciones de las muestras usando PCR convencional y PCR anidada. Como resultado se observó que en la segunda ampliificación del tester control (no sustraído) se obtuvo un barrido superior al marcador de peso molecular con una banda de aproximadamente 2 kb, mientras que en la muestra sustraída control se observaron varias bandas de distintos tamaños predominando una banda ligeramente menor de 2 kb. Este bandeo era similar al que presentó la muestra sustraída proporcionada por el kit, lo cual nos indica que, aunque un poco diferente, el proceso de sustracción que realizamos fue exitoso (figura 27).

A diferencia del tester control, el tester experimental no mostró ampliificación en la primera ronda de ampliificación sino hasta la segunda, observándose un barrido similar al del control con una banda de aproximadamente 500 pb; en el caso de la biblioteca sustraída el bandeo se presentó hasta la segunda PCR siendo más abundante que el del tester no sustraído (figura 28).



**Figura 27.-** Amplificación de la muestra control sustraída. Carriles 1 y 8: Marcadores de peso molecular 1 kb plus. Carriles 2, 4 y 6: Primera amplificación de la muestra sustraída control, el tester control no sustraído y la muestra sustraída proporcionada por el kit. Carriles 3, 5 y 7: Segunda amplificación de la muestra sustraída control, el tester control no sustraído y la muestra sustraída proporcionada por el kit.



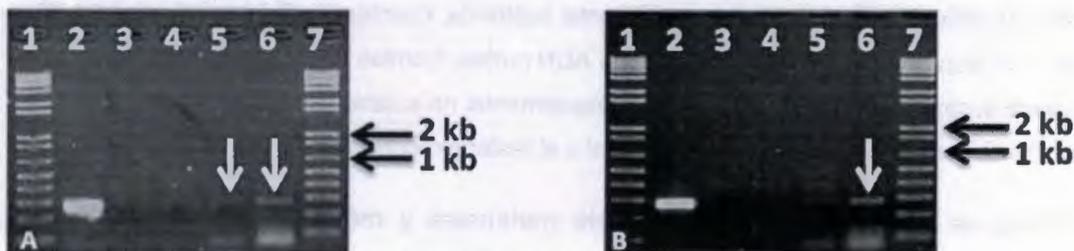
**Figura 28.-** Amplificación de la muestra experimental sustraída. Carriles 1 y 7: Marcadores de peso molecular 1 kb plus. Carril 2: Control negativo sin ADN molde. Carriles 3 y 5: Primera amplificación de la muestra sustraída experimental y el tester experimental no sustraído. Carriles 4 y 6: Segunda amplificación de la muestra sustraída experimental y el tester experimental no sustraído.

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, una prueba para determinar la eficiencia de la sustracción es la amplificación de un gen constitutivo del cual se sabe que es muy probable que no se amplifique fácilmente después de la sustracción; así, este gen se amplificaría en muestras que no han sido sustraídas (como el tester) a diferencia de muestras como la biblioteca sustraída en la cual, debido a este proceso, no habría amplificación. Para la biblioteca control se amplificó el gen *G3DPH*, el cual se detectó desde el primer muestra a los 18 ciclos de amplificación en el tester no sustraído, mientras que en la biblioteca sustraída se detectó diez ciclos después (figura 29).



**Figura 29.-** Prueba de eficiencia de sustracción de muestras control: tester control no sustraído (A) y muestra control sustraída (B). Carriles 1 y 6 (A y B): Marcador de peso molecular 1 kb plus. Carriles 2-6 (A y B): Amplificación a 18, 23, 28 y 33 ciclos respectivamente.

En la figura 30 se puede observar que en las amplificaciones del gen *MfActina* en tester no sustraído (A) y en la biblioteca sustraída (B) se encontró la banda característica de aprox. 300 pb claramente a los 35 ciclos. Sin embargo, en el tester experimental no sustraído se observó la amplificación desde ciclos anteriores, congruente con el hecho de que tiene más templado de actina y en la biblioteca sustraída se observó tenue al ciclo 30, lo cual apoya que hubo buena sustracción y el templado de actina disminuyó en la muestra.



**Figura 30.-** Análisis de eficiencia de sustracción de tester experimental no sustraído (A) y muestra experimental sustraída (B). Carriles 1 y 7 (A y B): Marcador de peso molecular 1 kb plus. Carril 2 (A y B): Control positivo. Carriles 3-6 (A y B): Amplificación a 20, 25, 30 y 35 ciclos respectivamente.

Durante la prueba de la Cinasa T4 se observó que sin ningún tratamiento el vector pBNR-lib mostró dos bandas, posteriormente sólo se observó una banda con los tratamientos aplicados de linearización y defosforilación, cuando el vector fue ligado después de haber sido fosforilado se observó que éste presentó una movilidad electroforética menor (presumiblemente debido a que regresó a su estructura circular) mientras que sin el tratamiento de fosforilación el vector no pudo retomar esta estructura (figura 31).



**Figura 31.-** Prueba de actividad de Cinasa T4. Carriles 1 y 8: Marcador de peso molecular 1 kb plus. Carril 2: Plásmido pBNR-Lib sin digerir. Carril 3: Plásmido digerido con EcoRI. Carril 4: Plásmido purificado. Carril 5: Plásmido concentrado y defosforilado. Carril 6: Plásmido fosforilado con Cinasa T4 y ligado. Carril 7: Plásmido defosforilado y tratado con ligasa.

Una vez realizada la prueba y comprobada la actividad de la T4 Cinasa se fosforiló la biblioteca sustraída, con un tiempo de incubación de 30 min a 37 °C para asegurar el máximo rendimiento de la reacción, después se purificó vía QIAquick y se verificó la concentración obteniéndose 5 µg de ADNc con resultados de índices 260/280 y 260/230 de 1.98 y 1.95 respectivamente. Este material se envió a secuenciar a la empresa MACROGEN, sin embargo informaron que el material enviado no era suficiente para el proceso, por lo que se amplificará nuevamente a partir del material resultante de la primera amplificación.

### 3.4.- DISCUSIÓN

Debido a sus ventajas, la HSS es una herramienta poderosa para la investigación de transcriptomas en la interacción planta-patógeno, proporcionando información valiosa para el desarrollo de mejores estrategias de control de enfermedades; sin embargo, el éxito de la técnica y por ende, la calidad de información que se obtenga, depende de muchos factores (ver 3.1.2 a 3.1.4), iniciando por la extracción del ARN total.

En nuestro estudio, la concentración de ARN total obtenida tanto de fragmentos foliares como de material fúngico se encontró entre los rangos reportados por otros autores para el mismo organismo o para tejidos similares de otros organismos (cuadro 22), pero menor a lo reportado por Rodríguez-García *et al.* (2010); esto puede deberse a diferencias en la composición bioquímica del tejido, a diferencias en el método de extracción y por supuesto, a la experiencia de quién manipula la muestra (Zumbo, 2012). Sin embargo, comparando los indicadores de pureza en los cuadros 19 y 22 y las

fotografías de los geles de electroforesis (figuras 18, 19 y 32), se puede observar que se obtuvo un material adecuado para trabajar e incluso mejor a lo reportado por autores como Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008) y Scott *et al.* (1998).

Aunque Islas-Flores *et al.* (2006) no reportaron las relaciones 260/280 y 260/230, Sánchez-Rodríguez *et al.* (2008) evaluaron el método para compararlo con el que ellos habían desarrollado, obteniendo valores de 1.80 y 1.77 para ambas relaciones de absorbancia respectivamente. En nuestro trabajo éstas fueron 2.1 y 2.2 que factores como la manipulación, el tipo de buffer y la presencia de contaminantes (entre ellos el fenol) son elementos importantes para la obtención de un material de trabajo óptimo, lo cual se verá reflejado en las lecturas de absorbancia. Algunos de los factores que pudieron influir en la intensidad de las bandas entre extracciones pudieron ser: contenido de humedad de las muestras, concentración de biomasa, entre otros; sin embargo, cabe recalcar que en ambos casos se obtuvo una concentración mayor a la reportada por Islas-Flores *et al.* (2006).

La síntesis de ADNc es uno de los pasos críticos para los estudios de transcriptómica de interacción, debido, entre otros factores, a que tanto la composición, longitud y representatividad de los transcritos son diferentes para los organismos involucrados (en este caso un hongo y una planta), por lo tanto es necesario que la enzima (o enzimas) utilizada posea características únicas que permitan obtener un material de calidad (Baskaran *et al.*, 1996).

TITANIUM® es una enzima sin actividad exonucleasa 5' diseñada a partir de la Taq polimerasa reportada por Kim *et al.* (1995). Entre otras características posee una mayor sensibilidad lo que permite obtener con altos rendimientos amplicones mayores a 2 kb y amplicones de 4 kb dependiendo del manejo de la muestra; sin embargo, por si sola esta enzima no funciona adecuadamente para aplicaciones como la construcción de bibliotecas de ADNc o de bibliotecas sustraídas de ADNc (Clontech, 2011).

Barnes (1994) reportó que usando un sistema enzimático dual (una polimerasa principal más una con actividad exonucleasa 3') se obtienen mejores resultados que usando un solo catalizador, se disminuye la tasa de mutaciones por ciclo (alrededor de 10 veces menos) y se pueden obtener amplicones de mayor tamaño. Esto es debido a que las polimerasas exo, que generalmente poseen gran fidelidad, no pueden amplificar

regiones de más de 2 kb, mientras que otras polimerasas, en especial aquellas diseñadas a partir de la Taq polimerasa, pueden sintetizar amplicones de más de 4 kb pero con una mayor cantidad de errores, por lo que en el sistema dual ambas polimerasas complementan sus funciones.

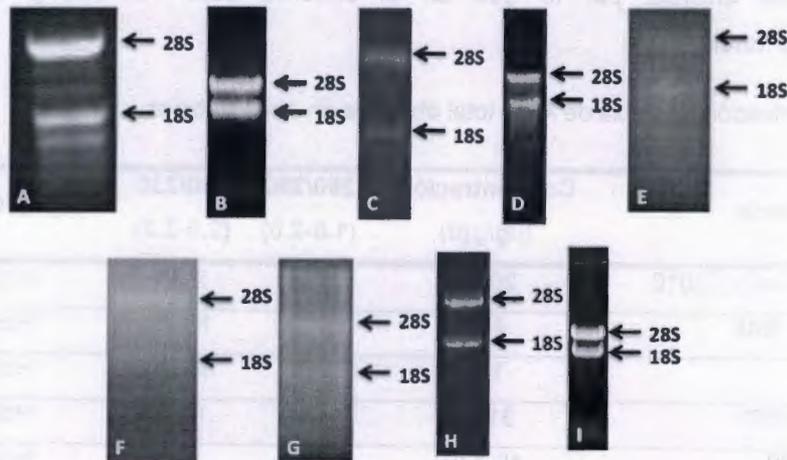
Cuadro 22.- Concentración y pureza de ARN total obtenida en otros trabajos.

Referencia	Concentración (µg/gpf)	260/280 (1.8-2.0)	260/230 (2.0-2.2)	Tejido/Célula
Rodríguez-García <i>et al.</i> , 2010	202.3	2.06	2.31	Hoja
Hughes y Galau, 1988	400	N. P.	N. P.	Hoja
Liao <i>et al.</i> , 2004	100	1.8	N. P.	Hoja
Logeman <i>et al.</i> , 1987	317.0	~2.0	~2.0	Hoja
Salzma <i>et al.</i> , 1999	40-120	1.9	1.7	Hoja
Sánchez-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008	48.67	1.77	2.02	Hoja
Woodhead <i>et al.</i> , 1997	152	1.99	N. P.	Hoja
Scott <i>et al.</i> , 1998	100.0	1.7	N. P.	Peridermis
Sánchez-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008	110.6	1.93	2.2	Micelio
Islas-Flores <i>et al.</i> , 2006	12.4	N. P.	N. P.	Micelio
Liu <i>et al.</i> , 2008	113.6	1.83	2.25	Apresorio

N. P.: Información no proporcionada en la bibliografía citada.

En nuestro caso se obtuvieron productos que iban desde 100 pb hasta poco más de 3 kb usando ambas versiones del kit de síntesis Advantage 2. Sin embargo, se observó que usando la nueva mezcla de polimerasas (Klentaq-1-Polimerasa con actividad correctora) se reducía el tiempo de la fase de elongación 1 min; esto pudo deberse entre otros factores a la disminución en la actividad enzimática debido al tiempo de almacenamiento y uso del primer sistema enzimático (más de un año) y/o al cambio en la polimerasa principal (de TITANIUM a Klentaq-1). Con respecto a la eficiencia de las mezclas enzimáticas, Clontech no ofrece estudio comparativo alguno que justifique el cambio de polimerasa principal. Sin embargo, en la documentación que acompaña a la enzima TITANIUM® se enfatiza que para la amplificación de ADNc con un tamaño igual o mayor a 4 kb es necesario que la muestra de la cual se parte sea abundante (Clontech,

2011) mientras que esto no es necesario con la enzima KlenTaq-1, logrando amplificar fragmentos de mayor tamaño (Barnes, 1994).



**Figura 32.-** Electroforesis en gel de muestras de ARN total reportadas en el cuadro 18, (A).- Rodríguez-García *et al.*, 2010. (B).- Liao *et al.*, 2004. (C).- Logerman *et al.*, 1987. (D).- Salzman *et al.*, 1999. (E).- Hojas infectadas de Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2008. (F).- Scott *et al.*, 1998. (G).- Micelio de *M. fijiensis* de Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2008. (H).- Islas-Flores *et al.*, 2006. (I).- Liu *et al.*, 2008.

El tester presentó un barrido diferente del driver ya que no superaba los 3 kb de tamaño, aún después de ajustar las condiciones de síntesis, a diferencia de Ryang *et al.* (2002) quienes obtuvieron perfiles similares para ambas muestras (figura 33). Sin embargo, se observó que en el caso del tester la mayor parte del ADNc se encontraba en la sección de 100-500 pb lo cual es similar a las observaciones de Xingquan *et al.* (2010) y Mendoza-Rodríguez *et al.* (2006) quienes reportaron insertos de ADNc de aproximadamente 500-700 pb para *Puccinia striiformis* y *Mycosphaerella fijiensis*.



**Figura 33.-** ADNc driver (D) y tester (T) de Ryang *et al.*, 2002.

En el análisis de ligación de tester control se observó que los amplicones con los adaptadores tenían un mayor tamaño que aquellos que no los contenían, aunque este resultado se obtuvo después de ajustar las condiciones de amplificación. Sin embargo, en el caso del tester experimental se observaron dos bandas en los amplicones con adaptadores lo cual indica la presencia de inespecificidades. Esta condición se intentó mejorar cambiando la temperatura y tiempo de anillamiento de los iniciadores sin tener éxito por lo que se decidió mantenerla como tal.

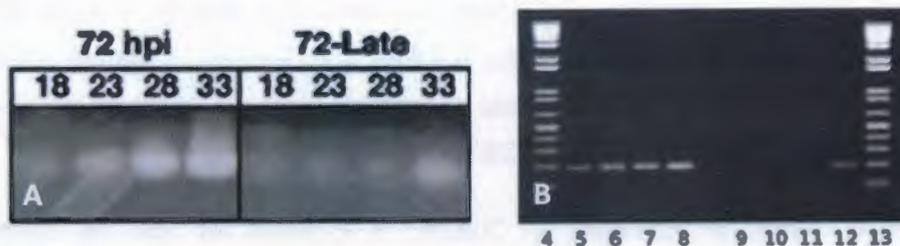
Después de las hibridaciones y amplificaciones de los genes expresados diferencialmente se observó que la biblioteca presentaba un bandeo muy definido el cual se acentuaba conforme las amplificaciones, a diferencia del tester no sustraído el cual presentó un barrido con pocas bandas definidas; esto coincide con las observaciones de Batista de Souza *et al.* (2011), Borrás *et al.* (2007), Mendoza-Rodríguez (2006), Ryang *et al.* (2002) y Kakamura *et al.* (1999) en cuyos estudios se presentó el mismo fenómeno (figura 34). Comparado con el mismo patosistema evaluado en el trabajo de Mendoza-Rodríguez *et al.* (2006), el presente estudio mostró una mejor sustracción, ya que en el caso de los autores mencionados, el ADNc después de sustraer no mostró un bandeo tan definido, el cual si se presentó en nuestro trabajo; lo cual es característico de las bibliotecas sustraídas.

En cuanto a la eficiencia de sustracción se obtuvo una diferencia de cinco ciclos con respecto a la muestra no sustraída [lo que corresponde a una reducción de 20 veces en la expresión según Bitner-Eddy *et al.* (2003)]. Esto pudo deberse a varios factores tales como la abundancia del gen aún después de las amplificaciones y el diseño de los iniciadores (ya que el someter al ADNc a restricción con Rsa I y Mme I dificultó localizar una región del gen factible para el diseño de los mismos); en este mismo aspecto Batista de Souza *et al.* (2011) y Bitner-Eddy *et al.* (2003) utilizaron el gen de actina de *Piper nigrum* y *Peronospora parasítica* respectivamente, obteniendo mejores resultados que los reportados en este estudio (figura 35). Sin embargo, en el trabajo de Bitner-Eddy *et al.* (2003) se observó una amplificación leve desde los 23 ciclos lo cual podría indicar que el proceso de sustracción no fue tan exitoso como mencionan los autores o que este gen podría no ser tan adecuado para la prueba de eficiencia de sustracción, aunque en este trabajo fue el único que cumplió los requisitos tanto de diseño como de amplificación, debido a los sitios de restricción para la doble digestión enzimática.

A través de este capítulo, se mostró evidencia de la construcción de una biblioteca sustraída de la interacción temprana *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* y *Musa acuminata* basándose en el trabajo previo de Prentis *et al.* (2010); cabe mencionar que durante la elaboración de la misma se enfrentaron diversos desafíos puesto que además del estudio citado, no existe otro trabajo similar reportado y ninguno enfocado a la interacción planta-patógeno que nos pudiera guiar en la elaboración de la misma, por lo que el presente representa un avance significativo para estudios futuros de la interacción entre *M. fijiensis* y *Musa* spp. Sin embargo, aún falta mucho por completar en este proyecto puesto que, aunque se logró construir la biblioteca, no se completó el objetivo inicial de determinar por métodos bioinformáticos las funciones putativas de las secuencias, debido mayormente a que gran parte del tiempo se consumió en estandarizar las condiciones correctas de síntesis de ADNc, amplificación de los iniciadores, ligación de adaptadores, entre otras operaciones propias de la construcción de bibliotecas sustraídas por supresión.



**Figura 34.-** Primera y segunda amplificación de bibliotecas sustraídas.- A.- Kakamura *et al.* (1999). B.- Ryang *et al.* (2002). C.- Batista de Souza *et al.* (2011). D.- Borrás *et al.* (2007). E.- Mendoza-Rodríguez (2006). Carriles de A: A).- Tester no sustraído. B).- Primera amplificación de biblioteca sustraída. C).- Segunda amplificación de biblioteca sustraída. Carriles de B: D0).- Driver. T0).- Tester. T1).- Primera amplificación de biblioteca sustraída. T2).- Segunda amplificación de biblioteca sustraída. T3).- Tercera amplificación de biblioteca sustraída. M).- Marcador de peso molecular de virus  $\lambda$  digerido con HindIII. Carriles de C: 1).- Primera amplificación de biblioteca sustraída. 2).- Segunda amplificación de biblioteca sustraída. 3).- Marcador de peso molecular 1 kb plus. Carriles de D: M).- Marcador de peso molecular. 1).- Biblioteca sustraída después de segunda amplificación. 2).- Control de kit. 3).- Tester experimental no sustraído. Carriles de E: 1).- Marcador de peso molecular O'RangeRuler 100 pb. 2 y 4).- Primera y segunda PCR de tester sin sustraer. 3 y 5).- Primera y segunda PCR de biblioteca sustraída.



**Figura 35.-** Prueba de eficiencia de sustracción de Bitner-Eddy *et al.* (2003) (A) y Batista de Souza *et al.* (2011) (B). Figura (A) 72 hpi: Tester no sustraído. Figura (A) 72-Late: Biblioteca sustraída. Carriles (A): Amplificación a 18, 23, 28 y 33 ciclos respectivamente. Carriles (B): 4 y 13).- Marcador de peso molecular. 5-8).- Amplificaciones a 18, 23, 28 y 33 ciclos del tester no sustraído. 9-12).- Amplificaciones a 18, 23, 28 y 33 ciclos de la biblioteca sustraída.

**3.5.- BIBLIOGRAFÍA**

- Barlow, J. J., A. P. Mathias y R. Williamson (1963). A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochemical and biophysical research communications*. 13(1), 61-66.
- Barnes, W. N. (1994). PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from  $\lambda$  bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, 2216-2220.
- Baskaran, N., R. P. Kandpal, A. K. Bhargava, M. W. Glynn, A. Bale y S. M. Weissman (1996). Uniform application of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res*. 6, 633-638.
- Batista de Souza, C. R., A. B. Santa-Brígida, R. Cabral-dos Santos, C. de N. Monteiro-Costa, S. Henri-Darnet y M. L. Harada (2011). Identification of sequences expressed during compatible black pepper-*Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. *Acta Physiol Plant*. 33(6), 2553-2560.
- Bitner-Eddy, P. D., R. L. Allen, A. P. Rehmany, P. Birch y J. L. Beynon (2003). Use of suppression subtractive hybridization to identify downy mildew genes expressed during infection of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology*. 4(6), 501-507.
- Borrás, O., O. Chacón, R. Portieles, C. Collazo, Y. López, C. J. Borroto, C. Ayra, M. Pujol, R. Rodríguez, M. Sunchís, M. Simón, O. Oliva, J. A. Crespo, H. García y V. Andino (2007). Identification of new disease resistance genes in tobacco via functional genomics. *Biotecnología aplicada*. 24(1), 76-78.
- Carninci, P., C. Kvam, A. Kitamura, T. Ohsumi, Y. Okazaki, M. Itoh, M. Kamiya, K. Shibata, N. Sasaki, M. Izawa, M. Muramatsu, Y. Hayashizaki y C. Schneider, 1996. High-efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper. *Genomics* 37, 327-336.
- Carpenter, M. A., A. Stewart y H. J. Ridgway (2005). Identification of novel *Trichoderma hamatum* genes expressed during mycoparasitism using subtractive hybridization. *FEMS Microbiology letters*. 251, 105-112.

- Chen, Y.-G., 2003. Construction of a normalized cDNA library by mRNA-cDNA hybridization and subtraction. *Methods in molecular biology*. 221, 33-40.
- Clontech Laboratories Inc. (2007). PCR-Select cDNA Subtraction Kit User Manual. Clontech Laboratories Inc. California. 36 p.
- Clontech Laboratories Inc. (2009). Advantage® 2 cDNA PCR kit & Polymerase Mix User Manual. Clontech Laboratories Inc. California. 17 p.
- Clontech Laboratories Inc. (2010). SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual. Clontech Laboratories Inc. California. 40 p.
- Clontech Laboratories Inc. (2011). TITANIUM® Taq PCR kits User Manual. Clontech Laboratories Inc. California. 11 p.
- Diatchenko, L., C. L. Yun-Fai, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov y P. D. Siebert (1996). Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93, 6025-6030.
- Diatchenko, L., S. Lukyanov, Y.-F. C. Lau y P. D. Siebert (1999). Suppression Subtractive Hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods in enzymology*. 303, 349-380.
- Distler, J. H. W., O. Distler, M. Neidhart y S. Gay. Subtractive hybridization in: *Arthritis Research: Methods and protocols*, Volume 1, Cope, A. P. (ed). Humana Press. New Jersey. Pp. 77-90.
- Ederly, I., L.L. Chu, N. Sonenberg, y J. Pelletier, 1995. An efficient strategy to isolate full-length cDNAs based on an mRNA retention procedure (CAPture). *Mol. Cell. Biol.* 2, 161-170.
- Evrogen Inc. (2012). Mint-2 cDNA synthesis kit User manual. Evrogen Inc. Moscow. 34 p.
- Farrell Jr., R. E. (2009). RNA methodologies. *Laboratory guide for isolation and characterization*. Academic press. PA. 717 p.

- Huang, X., Y. Li, Q. Niu y K. Zhang (2007). Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76, 753-760.
- Hughes, D. W. y G. Galau (1988). Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant molecular biology reporter.* 6(4), 253-257.
- Islas-Flores, I., L. Peraza-Echeverría, B. Canto-Canché y C. M. Rodríguez-García (2006). Extraction of high-quality, melanin-free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular Biotechnology.* 34, 45-50.
- Kakamura, T., J.-Z. Xiao, W.-B. Choi, T. Kochi, S. Yamaguchi, T. Teraoka y I. Yamaguchi (1999). cDNA subtractive cloning of genes expressed during early stage of appressorium formation by *Magnaporthe grisea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(8), 1407-1413.
- Lewin, B., J. E. Krebs, S. T. Kilpatrick y E. S. Goldstein (2011). *Genes X.* Jones and Barlett, U. S. A. 930 p.
- Liao, Z., M. Chen, L. Guo, Y. Gong, F. Tang, X. Sun y K. Tang (2004). Rapid isolation of high-quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*. *Preparative biochemistry & biotechnology.* 34(3), 209-214.
- Loomis, W. D. (1974). Overcoming problems of phenolic and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.* 31, 528-544.
- Liu, T.-B., J.-P. Lu, X.-H. Liu, H. Min y F.-C. Lin (2008). A simple and effective method for total RNA isolation of appresoria in *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Zhejiang University Science B.* 9(10), 811-817.
- Logemann, J., J. Schell y L. Willmitzer (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical biochemistry.* 163, 16-20.
- Lukyanov, S. A., D. Rebrikov y A. A. Buzdin (2007). Suppression subtractive hybridization, in: *Nucleic Acid Hybridization. Modern applications.* Buzdin, A. y S. Lukyanov (eds). Springer. The Netherlands. pp. 53-84.

- Mendoza-Rodríguez, M., A. Sánchez-Rodríguez, M. Acosta-Suárez, B. Roque, O. Portal y E. Jiménez (2006). Construcción y secuenciación parcial de una biblioteca sustractiva en "Calcutta 4" (*Musa AA*) en estadio temprano de infección con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biocología vegetal*. 6(4), 213-217.
- New England Biolabs. Mme I. [Online] Disponible en: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productr0637.asp>. [Acceso 22 de Octubre del 2012]
- Prentis, P. J., M. Woolfit, T.-H. R. Skye, D. Ortiz-Barrientos, A. Pavasovic, A. J. Lowe y P. M. Schenk (2010). Massively parallel sequencing and analysis of expressed sequence tags in a successful invasive plant. *Annals of Botany*. 106(6), 1009-1017.
- QIAGEN (2008). QIAquick spin handbook. March 2008.
- Rodríguez-García, C. M., L Peraza-Echeverría, I. R. Islas-Flores, B. B. Canto-Canché y R. Grijalva-Arango (2010). Isolation of retro-transcribed RNA from *in vitro* *Mycosphaerella fijiensis*-infected banana leaves. *Genetics and Molecular Research*. 9(3), 1460-1468.
- Ryang, S.-H., S.-Y. Chung, S.-H. Lee, J.-S. Cha, H. Y. Kim y T.-J. Cho (2002). Isolation of pathogen-induced Chinese cabbage genes by subtractive hybridization employing selective adaptor ligation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 299, 352-359.
- Salzma, R. A., T. Fujita, K. Zhu-Salzman, P. M. Hasegawa y R. A. Bressan (1999). An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant molecular biology reporter*. 17, 11-17.
- Sánchez-Rodríguez, A., O. Portal, L. E. Rojas, B. Ocaña, M. Mendoza, M. Acosta, E. Jiménez y M. Höfte (2008). An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. Interaction. *Mol. Biotechnol.* 40, 299-305.

- Scott Jr., D. L., C. W. Clark, K. L. Deahl y C. S. Prakash (1998). Isolation of functional RNA from periderm tissue of potato tubers and sweet potato storage roots. *Plant molecular biology reporter*. 16, 3-8.
- Slater, R. J. (1983). The extraction and fractionation of RNA, in: *Techniques in Molecular Biology*, Walker, J. M. y W. Gaastra (eds). Springer Netherlands. Burrell Row, Beckenham. pp. 113-133.
- Tan, S. C. y B. C. Yiap (2009). DNA, RNA and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine Biotechnology*. 2009.
- Wan, J., M. B. Wright, L. Cai, A. Flament y K. Lindpaintner, 2002. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics*. 3(12).
- Woodhead, M., M. A. Taylor, H. V. Davies, R. M. Brennan y R. J. McNicol (1997). Isolation of RNA from Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) fruit. *Molecular Biotechnology*. 7(1), 1-4.
- Wang, T. y Y.-L. Lu (1998). The principle and application of suppression subtractive hybridization. *Foreign Medical Science*. 20(6), 271-275.
- Xingquan, Z., W.Changyou, M. Ali, Z. Hong, L. Xinlun, L Weiyang y J. Wanquan (2010). Profiling gene expression patterns of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) resistance gene in new wheat germplasm. *Pak. J. Bot.* 42(6), 4253-4266.
- Zhu, Y. Y., E. M. Machleder, A. Chenchik, R. Li y P. D. Siebert, 2001. Reverse transcriptase template switching: A SMART™ approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*. 30(4), 892-897.



distribución de las partículas podría no ser uniforme generando zonas de mayor y menor densidad de esporas. La incorporación de técnicas de tinción como las mencionadas por Cavalcante *et al.* (2011) mejorarían las observaciones y proporcionarían mayor cantidad de información a discutir relacionándola con estudios moleculares o bioquímicos.

#### 4.1.2.- Observaciones y limitantes en la construcción de la biblioteca sustraída

Como se ha mencionado anteriormente uno de los factores que mayor impacto tienen sobre la construcción de la biblioteca sustraída es la extracción de ARN de calidad y en este aspecto la experiencia del usuario tiene gran importancia pues es la clave que permitirá obtener materiales adecuados. A pesar de ser la primera experiencia del autor en esta área, se considera que el ARN total extraído fue aceptable para la elaboración del trabajo aunque se puede mejorar para posteriores estudios.

La falta de información y antecedentes del uso de la modificación propuesta por Prentis *et al.* (2010) para la construcción de bibliotecas sustraídas para ser secuenciadas por el sistema Roche/454 fue una de las mayores limitantes en el presente trabajo. No hay otros reportes al respecto con los que se pudieran comparar los resultados, sobre todo en la síntesis de ADNc y la digestión de las muestras. El presente trabajo es uno de los primeros en utilizar dicha modificación en el estudio de un patosistema; sin embargo estos problemas se fueron resolviendo en el presente trabajo gracias a la amable cooperación del Dr. R. Skye (participante del estudio citado) quién nos proporcionó asesorías en algunas etapas de la construcción.

Aún con la ayuda del Dr. Skye, la síntesis de ADNc, la digestión con las enzimas de restricción y la ligación de los adaptadores fueron los principales obstáculos a vencer en la construcción de la biblioteca sustraída, obligándonos en muchas ocasiones a probar distintas condiciones a las reportadas en el manual o inclusive guiándonos de manuales de otras compañías, que en muchas ocasiones resultaron de gran ayuda.

La evidencia que indicó el éxito del proceso fue la amplificación de las muestras sustraídas y no sustraídas, cuya diferencia fue evidente y que se asemejaba a los resultados obtenidos en la amplificación de las muestras control y a las reportadas por otros autores (figura 33).

#### 4.2.- CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó la infección del hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* en fragmentos foliares de *Musa acuminata* cv. Gran Enano, las micrografías mostraron la germinación de las esporas, el desarrollo y crecimiento de las hifas y su penetración por los estomas del hospedero, por lo que se considera que se reprodujo la infección en condiciones *in vitro*.

Se construyó una biblioteca de ADNc utilizando la técnica Hibridación Sustractiva por Supresión de la interacción temprana de *Pseudocercospora fijiensis* con *Musa acuminata*, la cual fue preparada para su secuenciación masiva usando el sistema Roche/454; por ende no requirió de inserción alguna en vectores de clonación.

Aunque tanto el análisis de ligación como el de eficiencia de sustracción no mostraron resultados óptimos, si permitieron observar que podrían darse las condiciones adecuadas para continuar con el trabajo, sin embargo una prueba positiva resultó ser la comparación de electroforesis en gel de las muestras sustraída y no sustraída, las cuáles presentaron un perfil similar e incluso mejor que otros trabajos previamente reportados.

#### 4.3.- PERSPECTIVAS

El presente trabajo puede generar varias líneas de investigación a futuro, primeramente desde el punto de vista en el área de la biología molecular y la bioquímica se pueden investigar la expresión de los genes resultantes de la biblioteca sustraída, analizando cuáles son los de mayor expresión durante el proceso de infección, correlacionar esta información con el proteoma infeccioso para observar si todos los transcritos realmente se traducen a proteínas o existe algún evento de regulación en la síntesis de las mismas. Además se podrían analizar las principales vías metabólicas para ver si, aunque no directamente, participan en los eventos de interacción con el hospedero.

**4.4.- BIBLIOGRAFÍA**

- Burt, P. J. A., J. Rutter y F. Ramírez (1998). Airbone spore loads and mesoscale dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain. *Aerobiología*. 14(2-3), 209-214.
- Cavalcante, María de Jesús B., J. Escoute, J. P. Madeira, R. E. Romero, M. R. Nicole, L. C. Oliveira, C. Hamelin, M. Lartaud y J. L. Verdeil (2011). Reactive oxygen species and cellular interactions between *Mycosphaerella fijiensis* and banana. *Tropical Plant Biol.* 4(2), 134-143.
- Churchill, A. C. L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the Black Leaf Streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, development and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*. 12(4), 307-328.
- Degenhart, J., A. N. Al-Masri, S. Kürkcüoglu, I. Szankowski y A. E. Gau (2005). Characterization by Suppression Subtractive Hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Mol. Gen. Genomics*. 273, 326-335.
- de Carvalho, J. C., A. Pandey, B. O. Oishi, D. Brand, J. A. Rodríguez-León y C. R. Soccol (2006). Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. 29(3), 262-269.
- Peraza-Echeverría, L., C. M. Rodríguez-García y D. M. Zapata-Salazar (2008). A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. *Australian Plant Pathology*. 37, 460-463.
- Pérez, V. (2006). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra en bananos: estado actual y perspectivas. *Fitosanidad*. 10(1), 55-72.
- Prentis, P. J., M. Woolfit, T.-H. R. Skye, D. Ortiz-Barrientos, A. Pavasovic, A. J. Lowe y P. M. Schenk (2010). Massively parallel sequencing and analysis of expressed sequence tags in a successful invasive plant. *Annals of Botany*. 106(6), 1009-1017.

Salmerón-Santiago, K., J. P. Pardo, O. Flores-Herrera, G. Mendoza-Hernández, M. Miranda-Arango y G. Guerra-Sánchez (2011). Response to osmotic stress and temperature to the fungus *Ustilago maydis*. Arch. Microbiol. 193, 701-709.

Sánchez-Rodríguez, A., C. Martens, K. Engelen, Y. Van der Peer y K. Marchal (2010). The potential for pathogenicity was present in the ancestor of the Ascomycete subphylum Pezizomycotina. BMC Evolutionary Biology. 10:318.

Twizeyimana, M., P. S. Ojiambo, A. Tenkouano, T. Ikotun y R. Bandyopadhyay (2007) Rapid screening of Musa species resistance to black leaf streak using *in vitro* plantlets and detached leaves. Plant Dis. 91, 308-314.

