

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Construcción de un mapa genético de ligamiento del
hongo patógeno del banano *Mycosphaerella fijiensis*
usando marcadores moleculares**

Tesis que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias y Biotecnología de Plantas

Presenta:

Gilberto Manzo Sánchez

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2007



CONTENIDO

Reconocimientos.....	<i>i</i>
Agradecimientos.....	<i>ii</i>
Índice de figuras.....	<i>iii</i>
Índice de cuadros y tablas.....	<i>v</i>
Abreviaturas.....	<i>vii</i>
Resumen.....	<i>ix</i>
Abstract.....	<i>xi</i>
Introducción.....	1
Capítulo 1 Antecedentes.....	5
1.1 Biología de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet y su interacción con <i>Musa</i> spp.....	5
1.1.1 Introducción.....	6
1.1.1.1 Infección y sintomatología.....	9
1.1.1.2 Agente causal.....	9
1.1.1.3 Estado sexual.....	10
1.1.1.4 Estado asexual.....	12
1.1.1.5 Interacción <i>Mycosphaerella fijiensis</i> - <i>Musa</i> spp.	13
1.1.1.6 Estrategias de control.....	16

1.1.1.7 Genómica.....	17
1.1.2 Conclusiones.....	19
1.2 Mapeo en genomas de hongos fitopatógenos: aplicaciones y perspectivas.....	21
1.2.1 Introducción.....	22
1.2.1.1 Mapas genéticos.....	22
1.2.1.2 Mapas físicos.....	24
1.2.1.3 Mapeo genético y físico de genomas de hongos fitopatógenos.....	25
1.2.1.4 <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	29
1.2.1.5 <i>Didymella rabiei</i> (Kovachevski) (anamorfo: <i>Ascochyta rabiei</i> Pass. Labr.).....	30
1.2.1.6 <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend.: Fr. f. sp. <i>lycopersici</i> (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hansen.....	30
1.2.1.7 <i>Gibberella moniliforme</i> Wineland (anamorfo: <i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg).....	31
1.2.1.8 <i>Gibberella zeae</i> (Schwein.) Petch. (anamorfo: <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe).	32
1.2.1.9 <i>Leptosphaeria maculans</i> (Desmaz.) Ces. y De Not. (anamorfo: <i>Phoma lingam</i> (Tode ex Fr.) Desmaz.).	34
1.2.1.10 <i>Magnaporthe grisea</i> [(T.T. Hebert) Yaegashi y Udagawa] Marasas (anamorfo: <i>Pyricularia oryzae</i> T.T. Hebert)].....	35
1.2.1.11 Otros hongos fitopatógenos.....	37

1.2.1.12 Investigaciones realizadas en México.....	39
1.2.2 Conclusiones.....	40
Hipótesis.....	43
Objetivo general.....	43
Objetivos específicos.....	43
CAPITULO 2 Materiales y Métodos.....	57
2.1 Aislados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> y cruzas <i>in vitro</i>	57
2.2 Extracción del ADN.....	60
2.3 Identificación del locus MAR.....	62
2.4 Análisis de AFLP.....	63
2.41 Digestión del ADN genómico.....	63
2.42 Ligación de los adaptadores <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i>	64
2.43 Preamplificación de los marcadores AFLP.....	64
2.4. Amplificación selectiva de los marcadores AFLP.....	64
2.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	66
2.6 Análisis de marcadores microsatélites.....	67
2.7 Análisis de los datos y construcción del mapa.....	67
2.8 Estimación de la longitud del genoma y cobertura.....	68
Referencias.....	69

CAPITULO 3	Construction of a genetic linkage map of the fungal pathogen of bananas and plantains <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , causal agent of black leaf streak disease.....	71
3.1	Introduction.....	71
3.2	Materials and methods.....	74
3.2.1	Fungal isolates and growth conditions for crosses.....	74
3.2.2	DNA extraction.....	74
3.2.3	AFLP analysis.....	74
3.2.4	Linkage analysis and map construction.....	75
3.2.5	Estimation of genome length and coverage.....	77
3.3	Results.....	78
3.3.1	Mating between isolates.....	78
3.3.2	AFLP and SSR analysis of the mapping population.....	78
3.3.3	Linkage analysis and map construction.....	78
3.3.4	Segregation analysis reveals segregation distortion of mapped markers.....	83
3.3.5	Haplotype analysis.....	83
3.3.6	Genome length and coverage.....	84
3.4	Discussion.....	89
	References.....	95

CAPITULO 4	Conclusiones generales.....	101
CAPITULO 5	Perspectivas.....	103
	<i>Curriculum vitae</i>.....	107
	Lista de publicaciones.....	109

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de tesis estuvo bajo la dirección del **Dr. Andrew James Kay**, realizándose en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, bajo la dirección de la **Dra. June Simpson** y en el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo, Campus Baillargue, Francia bajo la responsabilidad del **Dr. Jean Carlier** a quienes agradezco enormemente su apoyo brindado durante todo el proceso del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que financió el proyecto No. 37602-B y por los apoyos del Programa Integral para Fortalecimiento del Postgrado.

El autor recibió una beca otorgada por el CONACYT (No. 128982) para estudios de Doctorado.

Al Rector de la Universidad de Colima el **M.C. Miguel Ángel Aguayo López**, por la oportunidad de brindarme el apoyo mediante la beca otorgada.

Al **Dr. Leonardo Gutiérrez Chávez** Secretario General del Sindicato Único de Trabajadores de la Universidad de Colima por su apoyo en el momento oportuno para mi titulación y obtención del grado.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial (**Drs. Andrew James Kay, June Simpson y Rosa María Escobedo**) por brindarme y orientarme con sus importantes observaciones y comentarios.

Un gran agradecimiento especial a los **Drs. Luís Carlos Rodríguez Zapata, Blondy Canto Canche, Cecilia Rodríguez García**, por su apoyo y amistad.

A la familia **Torres Dzib** por abrirme las puertas, darme la oportunidad de ser parte de ustedes y por brindarme el apoyo durante mi estancia en Mérida.

A mis amigos del laboratorio de biotecnología molecular, **Laura Conde, Laura Isabel Sansores, Néstor Raigosa, Rosa Grijalva, Leticia Peraza, Nuvia Kantúm**, y a los integrantes de los laboratorios 3 y 4 del CINVESTAV unidad Irapuato, **Miriam Díaz, Katia Gil, Emigdia Alfaro, Juan Caballero y Anastasio Cortés**, por su apoyo y compañerismo. A **Francisco Luna** por su apoyo durante el análisis estadístico.

A mis padres el **Lic. J. Félix Manzo Llorentes** y la **Sra. María Inés Sánchez Mendoza**, quienes me dieron vida, me cuidaron y me guiaron por el buen camino de la superación, con el propósito de triunfar en la vida...

A mis hermanos **Lic. Víctor Hugo Manzo Sánchez** y **L.A. Félix Manzo Sánchez**, por su apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida.

A mi esposa **C.P. Nora Amparo Casillas Gómez**, por apoyarme y estar conmigo en todo momento por difícil que fue.

A mi hijo **Gilberto Manzo Casillas**, por darme felicidad y saber que en la vida nunca se es hijo, hasta que se es padre...

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO 1

- Figura 1.1** Síntomas causados por Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano Enano Gigante (Subgrupo Cavendish, AAA)..... 7
- Figura 1.2** Ubicación de las regiones bananeras en México en las cuales se encuentra Sigatoka negra (Orozco-Santos *et al.*, 2000)..... 8
- Figura 1.3** Estados de los síntomas de la enfermedad de Sigatoka negra en banano Enano Gigante. A) Primer estado de estría. B) Segundo estado de estría. C) Segundo estado de mancha. D) Tercer estado de mancha..... 10
- Figura 1.4** Ciclo de vida del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra de bananos y plátanos (*Musa* sp.)..... 12
- Figura 1.5** Características morfológicas de colonias de *Mycosphaerella fijiensis* de tres lugares de la región del Estado de Colima..... 13
- Figura 1.6** Esquema gráfico de los principales pasos requeridos para el mapeo genético y mapeo físico en genomas de hongos fitopatógenos....:..... 28

CAPITULO 2

- Figura 2.1** Procedimiento para realizar cruza bajo condiciones *in vitro* del hongo *Mycosphaerella fijiensis*..... 61

CAPITULO 3

Figure 3.1	The genetic linkage map of <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	88
Figure 3.2	Segregation ratios for LGs 2, 3, 10, 12, 21 and 22.	89

INDICE DE CUADROS

CAPITULO 1

Cuadro 1.1	Características de mapas genéticos y mapas físicos desarrollados en hongos fitopatógenos....	26
-------------------	--	----

CAPITULO 2

Cuadro 2.1	Aislados monoascosporicos seleccionados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> de diferentes países y hospederos.....	58
Cuadro 2.2	Características de cada una de las 38 parejas formadas de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	59
Cuadro 2.3	Secuencia de oligonucleótidos AFLP usadas para la amplificación selectiva.....	65
Cuadro 2.4	Total de combinaciones de oligonucleótidos AFLP usadas para el análisis de la progenie de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (CIRAD86 X CIRAD139A).....	66

CAPITULO 3

Table 3.1	<i>In vitro</i> random crosses between 12 single ascospore isolates of <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ...	76
Table 3.2	Segregation and mapping data for AFLP markers generated for the construction of the genetic linkage map of <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ..	80
Table 3.3	Characteristics and segregation of the 32 SSR markers for the construction of the genetic linkage map of <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	82

Table 3.4	Length of linkage group, number of markers, average spacing between markers, largest genetic distance of the genetic linkage map of <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	85
Table 3.5	Estimated recombination between the <i>MAT</i> locus and twelve markers.....	86

ABREVIATURAS

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario
- AFLP:** polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados
- avr:** avirulencia
- BAC:** cromosoma bacteriano artificial
- CHEF:** contour-clamped homogeneous electric field
- cM:** centimorgan
- CTAB:** bromuro de acetiltrimetilamonio
- EST:** secuencia expresada etiquetada
- GPF:** proteína fluorescente verde
- ITS:** espacio interno transcrito
- kpb:** kilopares de bases
- LOD:** logarithm of the odds
- Mb:** megabases
- PCR:** reacción en cadena de la polimerasa
- PDA:** agar de papa dextrosa
- PFGE:** geles de electroforesis de campo pulsante
- QTL:** loci de característica cuantitativa
- RAPD:** ADN polimórfico amplificado al azar
- RFLP:** polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción
- SCARs:** regiones amplificadas de secuencias caracterizadas
- SNP:** polimorfismos de nucleótidos simples
- SSR:** secuencia simple repetida
- STS:** sitios de secuencias etiquetadas

Resumen

El hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causante de la Sigatoka negra, es la enfermedad del follaje más destructiva de bananos y plátanos. Se encuentra ampliamente distribuido en casi todas las regiones productoras del mundo, llega a provocar grandes pérdidas económicas cuando no se tiene un método de control adecuado. Por lo tanto, surge la necesidad de implementar nuevas tecnologías moleculares para un mejor entendimiento y manejo del patógeno. Con este fin se han desarrollado mapas genéticos en algunos hongos fitopatógenos, además mediante el apoyo de los marcadores de ADN se ha podido identificar y etiquetar los genes deseables, como por ejemplo genes de avirulencia. En este estudio se realizaron cruza en condiciones *in vitro* entre aislados procedentes de varios países y diferentes cultivares. La cruza entre el aislado CIRAD86 (de Camerún, *mating type* +) y CIRAD139A (de Colombia, *mating type* -) fue usada para construir un mapa genético de ligamiento. Se analizó una progenie formada por 61 individuos mediante marcadores moleculares, siendo 298 marcadores AFLP y 16 marcadores SSR los que integraron el mapa genético de ligamiento. El mapa fue generado usando el software JoinMap 3.0 con un valor mínimo de LOD ≥ 3.0 . Se obtuvieron veintitrés grupos de ligamiento, conteniendo 5 o más marcadores estos cubrieron una longitud de 1879 cM. El locus *mating type* no pudo ser mapeado. La densidad promedio entre marcadores fue de 5.9 cM (un rango de 1 a 21 cM). El tamaño físico en relación a la distancia genética fue de aproximadamente 40.9 kpb/cM. El tamaño del genoma estimado para *M. fijiensis* fue calculado para ser 4303.5 cM. El mapa genético de ligamiento aquí reportado es el primero en este importante patógeno de bananos y plátanos, el cual podría ser de gran utilidad para usos en estudios de evolución con otros hongos y como anclaje para ensamblar la secuencia del genoma de *M. fijiensis*.

Abstract

The fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causes black leaf streak disease (commonly known as black Sigatoka), the most economically important disease of the foliage of banana and plantain. It is widely distributed in almost all producing regions of the world and causes great economic losses. The implementation of new molecular technologies will lead to a better understanding and more sustainable management of the pathogens. Genetic linkage maps have been developed for some phytopathogenic fungi. By means of the support of DNA markers it has been possible to map and identify genes, for example, avirulence genes. In this study crosses were made under *in vitro* conditions between isolates from different countries and cultivars. A genetic linkage map of the fungal plant pathogen *M. fijiensis* was developed. A cross between the isolates CIRAD86 (from Cameroon) and CIRAD139A (from Colombia) was analyzed using molecular markers and the *MAT* locus. The genetic linkage map consists of 298 AFLP and 16 SSR markers with twenty three linkage groups, containing 5 or more markers, covering 1879 cM. Markers are separated on average by around 5.9 cM. The *MAT* locus segregated in a 1:1 ratio but could not be successfully mapped. The physical size in relation to genetic distance was approximately 40.9 kb/cM. The estimated total haploid genome size was calculated using the genetic mapping data at 4303.5 cM. The genetic linkage map reported in this study is the first for this important foliar pathogen of banana. The great utility of the map will be for evolutionary studies in comparison with other fungi, to identify quantitative trait loci associated with aggressiveness or oxidative stress resistance and to provide a framework for *M. fijiensis* genome sequencing.

INTRODUCCIÓN

El fruto de los bananos y plátanos (*Musa* spp.) es uno alimento muy importante por su alto contenido de carbohidratos, vitaminas A y B, así como de minerales como el potasio y el calcio. Los bananos y plátanos se cultivan principalmente en zonas tropicales y subtropicales. El cultivar Enano Gigante (Subgrupo Cavendish, *Musa* AAA) es el banano más cultivado y consumido en todo el mundo. Los países de América Latina y el Caribe son los principales productores. En México se estima que hay una superficie de 72, 700 hectáreas distribuidas en tres importantes regiones del país, cultivadas con bananos y plátanos, que aportan una producción media de 2.2 millones de toneladas de fruta por año. De esta producción, el 9% es para consumo local y el resto se exporta a los Estados Unidos de América y Europa y un por ciento a Asia (Orozco-Santos *et al.*, 2000).

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* es el agente causal de la Sigatoka negra, la cual ocasiona una necrosis y reducción del área foliar de las plantas de bananos y plátanos, que resulta en una disminución del 20% al 70% en el rendimiento de la fruta y provoca una disminución de la capacidad fotosintética. Esta pérdida se da cuando no existen métodos de control apropiados (Stover, 1983, Mobambo *et al.*, 1996). *M. fijiensis* se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de las regiones productoras del mundo (Stover, 1980; Marín *et al.*, 2003). La Sigatoka negra es controlada principalmente con la aplicación de fungicidas (Stover, 1980; Marín *et al.*, 2003), lo que implica hasta el 40% del costo total de la producción. Esta práctica también ocasiona un aumento en el grado de contaminación ambiental y daños en la salud humana (Stover y Simmonds, 1987).

Como una alternativa para contrarrestar los problemas antes mencionados, se ha trabajado en la generación de híbridos resistentes a la enfermedad. Este proceso se ha llevado acabo en varios centros de investigación de diferentes países, sin embargo se requiere de una intensa labor de mano de obra, manejo y bastante tiempo (Vuylsteke *et al.*, 1997). La fruta de los híbridos obtenidos no es de buena calidad para el mercado de exportación, en comparación al banano del cultivar Enano Gigante (Orozco-Santos *et al.*, 2000). Sin embargo, recientemente se han utilizado herramientas de la ingeniería genética para generar plantas transgénicas de cultivares de interés comercial resistentes a Sigatoka negra (Sági, 2000), pero hasta hoy en día los materiales modificados genéticamente no han

sido liberados para su explotación comercial en México (Orozco-Santos et al., 2000).

Conociendo los problemas fitosanitarios a los que se enfrenta la industria bananera a escala mundial, algunos grupos de investigación se enfocaron a realizar investigaciones implementando herramientas moleculares para tener un mejor conocimiento del genoma de *M. fijiensis*. En el 2003, se conformó el Consorcio de Genómica de *Mycosphaerella*, en el cual participan varias instituciones, incluyendo al CICY. El objetivo del Consorcio es la implementación y utilización de técnicas moleculares para lograr un mejor conocimiento del patógeno para su posterior manejo. Entre las prioridades se encuentra la construcción y caracterización de bibliotecas tipo cromosoma bacteriano artificial (BAC), la identificación de ADNc (ADN complementario), EST (fragmentos de genes expresados) y microarreglos de la interacción *Musa-M. fijiensis*. Otra de las prioridades es la obtención de poblaciones F₁ desarrolladas bajo condiciones *in vitro* para ser utilizadas en la construcción del primer mapa genético de ligamiento de *M. fijiensis* mediante el análisis de marcadores de ADN y por último, también es prioritaria la secuenciación de su genoma (Roux et al., 2003).

Los avances logrados hasta la fecha por el grupo de investigación del CICY en colaboración con los institutos de investigación: Plant Research Internacional (PRI), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) de Holanda; el Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), de Francia y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) unidad Irapuato, de México han permitido un mejor conocimiento del genoma de *M. fijiensis*. Entre ellos se menciona el análisis de la determinación del cariotipo y tamaño del genoma, logrando identificarse de 8 a 13 cromosomas y con un tamaño de genoma de 27 a 35 Mbp (Rodríguez-García et al., 2006). Sin embargo, resultados preliminares de la secuencia del genoma de *M. fijiensis* se ha determinado un tamaño de aproximadamente 70 Mb (Kema G.H.J. y Goodwin S.B. comun. person.).

También se llevó a cabo la construcción de una biblioteca tipo BAC, desarrollada con un tamaño promedio de inserto de 90 kb y la cual representa aproximadamente 4.9 X el equivalente del genoma. Se encontró que aproximadamente el 39% de la biblioteca corresponde a ADN altamente repetitivo (B. Canto-Canché comun. person.). Otro importante logro fue el aislamiento y caracterización del idiomorfo MAT, el cual permitirá mediante un análisis de la PCR múltiplex, identificar el MAT1-1 y

el MAT1-2 y obtener información acerca de la evolución y ecología de las especies del genero *Mycosphaerella* que coexisten e interactúan con un hospedero en común, el banano (Conde-Ferrález *et al.*, 2007).

La generación de cruas controladas entre aislados de *M. fijiensis* es de importancia lograr cruzar entre aislados que portan ciertas características de interés agronómico, lo cual es esencial para generar una descendencia que puede ser analizada para estudiar la segregación del gene o carácter deseable, así como también marcadores moleculares, otra alternativa es cruzar dos aislados que sean genéticamente divergentes con la finalidad de obtener una descendencia altamente polimórfica (Jurgenson *et al.*, 2002).

Por último, el desarrollo de un mapa genético de ligamiento de *M. fijiensis* permitirá localizar marcadores moleculares ligados a genes de interés, el mapeo del locus MAT, el entendimiento de la organización del genoma, el análisis comparativo con otras especies del mismo género, su evolución, determinación del tamaño del genoma y análisis de loci de características cuantitativas (QTL) entre otras importantes aplicaciones (Jones *et al.*, 1997 y Jurgenson *et al.*, 2002).

REFERENCIAS

- Conde-Ferrález, L., Waalwijk, C., Canto-Canché, B., Kema, G.H.J., Crous, P., James, A. and Abeln, E.** 2007. Isolation and characterization of the *mating type* locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana. *Mol Plant Pathol* 8:111-120.
- Rodríguez, C.M., Raigosa-Flores, N., Conde-Ferrález, L., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché B., Espadas-Manrique C., A. James-Kay.** 2006. Variation in electrophoretic karyotype between Mexican isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 236-241.
- Jones, D.R.** 2000. Disease of Banana, Abaca and Enseté. D.R. Jones, ed. CAB International, Wallingford, London.
- Jones, N., Ougham, H., and Thomas, H.** 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol.* 137:165-177.

- Jurgenson, J.E., Bowden, R.L., Zeller, K.A., Leslie, J.F., Alexandra, N.J. and Plattner, R.D.** 2002. A genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Genetics* 160: 1451-1460.
- Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M., and Sutton, T.B.** 2003. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87:208-222.
- Mobambo, K.N., Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C., and Zuofa, K.** 1996. Season and plant age effect evaluation of plantain for response to black sigatoka disease. *Crop Protection* 15: 609-614.
- Orozco-Santos, M., Fariás-Larios, J., Manzo-Sánchez, G., and Guzmán-González, S.** 2000. Black sigatoka in México. *InfoMusa* 10:33-37.
- Sági, L.** 2000. Genetic engineering of banana for disease resistance-future possibilities. En: D.R. Jones (ed.) *Diseases of Banana, Abacá and Enset*, CABI Publishing, Wallingford,
- Stover R.H.** 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease* 64: 750-756.
- Stover R.H.** 1983. Effet du *Cercospora* noir sur les plantains en Amérique Centrale. *Fruits* 38: 326-329.
- Stover R.H., and Simmonds N.W.** 1987. *Bananas*. 3rd ed. Longman Scientific & Technical, Essex, England.
- Vuylsteke D., Ortiz R., Ferris R.S.B., and Crouch J.H.** 1997. Plantain improvement. *Plant Breeding Reviews* 14:267-320.

CAPITULO 1

Antecedentes

1.1 Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su Interacción con *Musa* spp.¹

Resumen. El rayado negro de la hoja o Sigatoka negra, causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, es la enfermedad del follaje más destructiva de bananos y plátanos, se encuentra ampliamente distribuido en casi todas las regiones productoras del mundo y provoca grandes pérdidas económicas. *M. fijiensis* tiene un alto nivel de diversidad genética ocasionada por su reproducción sexual y ciclo de vida corta, que ocasiona numerosas generaciones por año y un elevado índice de recombinación genética. Estas características del patógeno dificultan su control, el cual se basa principalmente en la aplicación continua de fungicidas, y la implementación de prácticas de cultivo para reducir las fuentes de inóculo y las condiciones favorables para la enfermedad. Existen cultivares resistentes obtenidos a través del mejoramiento genético tradicional; sin embargo, algunas características agronómicas como la calidad de los frutos no son aceptadas totalmente por el público consumidor. El uso de la ingeniería genética promete un gran avance en el control de Sigatoka negra, ya que permite estudiar y modificar tanto al hospedero como el patógeno para diseñar estrategias de manejo de la enfermedad. En esta revisión, se presentan los avances del conocimiento en la biología y la interacción entre *Musa* spp. y *M. fijiensis*, así como la utilización de algunas técnicas moleculares para el estudio del genóma de hongo.

Palabras clave adicionales: Hongo fitopatógeno, Musáceas, enfermedad, síntomas, genómica.

Artículo publicado en la Revista Mexicana de Fitopatología 2005. 23 (1): 86-95.

Abstract. Black leaf streak or black Sigatoka, caused by the ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis*, is the most destructive disease of the foliage of bananas and plantains. It is widely distributed in almost all producing regions of the world and causes great economic losses. *M. fijiensis* has a high level of genetic diversity due to its sexual reproduction and short life cycle that leads to numerous generations per year and a high level of genetic recombination. These characteristics of the pathogen make its control difficult. Control is based mainly on the continuous application of fungicides and the implementation of cultural practices to reduce the source of inoculum and the favorable conditions for the disease. There are resistant cultivars obtained through the traditional genetic improvement; however, some agronomic characteristics such as fruit quality are not totally accepted by the consumer. The application of genetic engineering promises great progress in the control of black Sigatoka, since it allows the design of management strategies through the study and modification of the host and pathogen. In this review, we present advances in knowledge of the biology and the interaction between *Musa* spp. and *M. fijiensis*, as well as the use of some molecular techniques for the study of the genome of this fungus.

Additional keywords: Phytopathogenic fungi, Musaceae, disease, symptoms, genome.

1.1.1 Introducción

Los bananos y plátanos (*Musa* spp.) son plantas herbáceas, poliploides y perennes ampliamente adaptados a regiones tropicales y subtropicales, de las cuales se pueden distinguir tres partes importantes de la planta: el cormo con hijuelos y el sistema radical, el pseudotallo con el sistema foliar y el racimo o inflorescencia. Dos especies diploides, *M. acuminata* Colla (genoma A) y *M. balbisiana* Colla (genoma B), son los ancestros comunes de todos los cultivares triploides y tetraploides conocidos (Simmonds y Shepherd, 1955). El banano se considera el segundo frutal tropical más importante por su consumo mundial, así como por su contenido de fuentes de carbono, almidón, vitaminas y minerales.

La producción anual en el mundo asciende a los 90 millones de ton, siendo los países de América Latina los principales exportadores de fruta fresca hacia los Estados Unidos y Europa; sin embargo, en estos países el 15% de la producción se exporta y el resto se destina al consumo local e industrialización (FAO, 2001). Dentro de las enfermedades que causan

severos daños en las plantaciones bananeras se encuentra el mal de Panamá causada por el hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *ubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder and H.N. Hans., nematodos [*Radopholus similis* (Cobb) Thorne] y el virus bunchy top del banano (Jones, 2000). La Sigatoka negra (debido al color pardo oscuro o negro de las rayas y manchas) causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [forma imperfecta *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton], es la enfermedad más destructiva y devastadora de las hojas de bananos y plátanos a escala mundial (Marín *et al.*, 2003; Stover, 1980).

La severidad de éste patógeno se magnifica en un sistema agrícola como el de las Musáceas, en el cual la propagación vegetativa (reproducción asexual) y el cultivo en grandes extensiones de tierra de un clon genéticamente uniforme, lo hace altamente vulnerable a ataques epidémicos de la enfermedad (Clay y Kover, 1996). Este patógeno se caracteriza por causar manchas foliares y provocar infecciones masivas que reducen el área fotosintética de las plantas (Fig. 1), causando la madurez prematura de los frutos y como consecuencia la disminución de la producción de fruta en un 38% (Stover, 1980; Marín *et al.*, 2003). *M. fijiensis* se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de los países productores del mundo (Mourichon y Fullerton, 1990; Stover, 1980; Marín *et al.*, 2003), incluyendo las regiones bananeras de México (Fig. 2) (Orozco-Santos *et al.*, 2000).



Figura 1.1. Síntomas causados por Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano Enano Gigante (Subgrupo Cavendish, AAA).

Aunque, se detectó la Sigatoka negra por primera vez en 1963 en las islas Fiji (Rhodes, 1964) ubicadas en el área del Sudeste Asiático, su amplia distribución en los alrededores del Pacífico sugiere que ha estado presente en la región mucho antes de su descubrimiento; posteriormente, se dispersó a todas las áreas productoras del mundo (Stover, 1978). El control de esta enfermedad se basa principalmente en el uso de fungicidas, cuya aplicación genera un costo de 30 a 40% de la producción; sin embargo, esta medida de control provoca contaminación al ambiente, problemas de salud humana y genera resistencia del hongo. El objetivo de la presente revisión es dar a conocer los estudios que se han realizado sobre la biología y la interacción de Sigatoka negra con los bananos y plátanos, así como la aplicación de algunas técnicas moleculares en el estudio del patógeno.



Figura 1.2. Ubicación de las regiones bananeras en México en las cuales se encuentra Sigatoka negra (Orozco-Santos *et al.*, 2000)

1.1.1.1 Infección y Sintomatología.

Las esporas (ascosporas y conidios) de *Sigatoka* negra se desplazan a través del viento, por la lluvia y el rocío de agua, las cuales son la principal fuente de infección (Meredith y Lawrence 1969; Stover, 1980; Marín *et al.*, 2003). Las ascosporas y conidios germinan en la hoja (Stover y Simmonds, 1987), seguido por un crecimiento epifílico de los tubos germinativos, los cuales entran a la hoja a través del estoma (Meredith y Lawrence 1969), para después proliferar en tejido intercelular de la hoja (Meredith y Lawrence 1969). El patógeno establece una relación biotrófica durante 3 a 4 semanas después de la penetración por el estoma antes de la aparición de síntomas necróticos (Hoss *et al.*, 2000). El desarrollo de la enfermedad se ve favorecido cuando existe una alta humedad y altas precipitaciones, mientras que las temperaturas menores de 20°C y períodos secos inhiben el crecimiento del hongo (Craenen, 1998).

De acuerdo a Meredith y Lawrence (1969), se han identificado seis estados de la evolución de síntomas de la enfermedad: uno de punto, dos de raya y tres de mancha (Fig. 3): 1) Estado de punto inicial: Aparición de puntos pequeños de color amarillo pálido de 0.25 mm de diámetro visibles en el envés de la hoja; 2) primer estado de estría: Formación de estrías de color castaño de 1 mm de ancho por 2 mm de largo, visibles en el haz y paralelas a las venas laterales de la hoja; 3) segundo estado de estría: Alargamiento de las estrías hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho, las cuales toman una coloración marrón oscuro y son visibles en el envés como rayas amarillas; 4) primer estado de mancha: Ensanchamiento de las estrías que se tornan color marrón oscuro y son rodeadas por una zona amarilla pálida; puede considerarse el primer estado de mancha; 5) segundo estado de mancha: Inicio del colapso del centro de color negro de la mancha y formación de un halo amarillo ligero en el tejido de la hoja que rodea el borde acuoso de la mancha; 6) tercer estado de mancha: El centro de la mancha se seca, adquiere un color gris claro y además se torna hundido o comprimido. La mancha es rodeada por un borde estrecho bien definido, color pardo oscuro o negro. Entre este borde y el color verde normal de la hoja, hay frecuentemente una zona de transición amarillo brillante.

1.1.1.2 Agente causal.

El agente causal de la *Sigatoka* negra de bananos y plátanos (*Musa* spp.), presenta en su ciclo de vida, un estado perfecto que es la fase ascógena o

sexual y un estado imperfecto que es la fase conídica o asexual (Fig. 4). El hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es el estado perfecto y pertenece a la clase Ascomycetae; el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, es el estado imperfecto y pertenece a la clase Hyphomycetae.

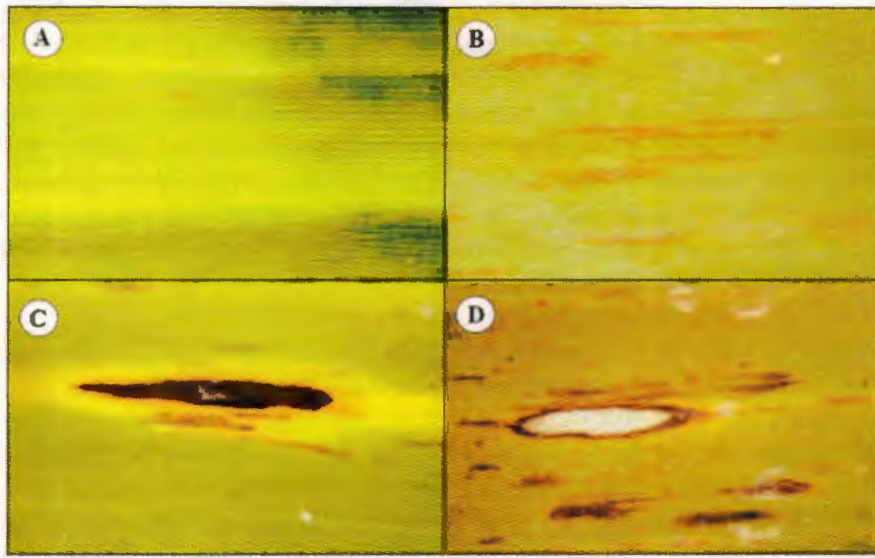


Figura 1.3. Estados de los síntomas de la enfermedad de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano Enano Gigante. A) Primer estado de estría. B) Segundo estado de estría. C) Segundo estado de mancha. D) Tercer estado de mancha.

1.1.1.3 Estado sexual

Se caracteriza por la formación de peritecios, espermagonios y ascosporas. El peritecio y espermagonio ocurren en proporciones variables durante los estados 2 y 3 de desarrollo de los síntomas. Los espermagonios son más abundantes en el envés de la hoja y frecuentemente se desarrollan en la cámara subestomática; constituyen la parte masculina y en estado maduro contienen espermátida en forma de bastoncillos o varillas hialinas que actúan como gametos, que fertilizan a los peritecios que aparecen en los estados 5 y 6 de la enfermedad (Meredith y Lawrence, 1969).

Los peritecios son estructuras anfígenas, globosas con un ostiolo esférico papilado, de paredes pardo oscuras y células poligonales, ligeramente hundidos en el tejido de la hoja. Se presentan más frecuentemente en el envés de las hojas y en su estado maduro contienen numerosas ascas bitunicadas que contienen ocho ascosporas cada una, como el resultado del proceso sexual (Meredith y Lawrence, 1969). Las ascosporas son hialinas, fusiformes, biseriadas, septadas con una constricción leve al nivel del septo y clavadas en el asca con la parte más grande o prominente de la célula. El tamaño de las ascosporas es de 11.5 a 15.6 x 2.5 a 5.0 μm con un promedio de 13.7 x 3.7 μm (Meredith y Lawrence, 1969; Mülder y Stover, 1976); germinan en ambos lados de la superficie de las hojas y penetran al tejido del hospedero a través de los estomas.

Las hojas infectadas densamente, liberan las ascosporas durante un período de dos a cuatro semanas más que cuando las hojas se cortan (saneamiento) y se colocan en el suelo (Stover, 1980; Marín *et al.*, 2003; Orozco-Santos, 1998). Las ascosporas son la fuente principal de inóculo de la enfermedad (Stover, 1980), puesto que son diseminadas por el viento y depositadas principalmente en la hoja "cigarro" y en las cuatro hojas más jóvenes de la planta (Mülder y Holliday, 1974; Mülder y Stover, 1976). En relación a las características de las colonias (Fig. 5) provenientes de ascosporas cultivadas *in vitro* en medio papa-dextrosa-agar (PDA), se ha observado que después de 14 días de crecimiento a una temperatura de 26°C y con un fotoperíodo de 12 h, presentan un color gris-oscuro a blanco rosado, de forma esférica o con zonas irregulares y una consistencia algodonosa o compacta, dependiendo si las ascosporas proceden de huertos con manejo rústico, semintensivo o intensivo (Manzo-Sánchez *et al.*, 2001).

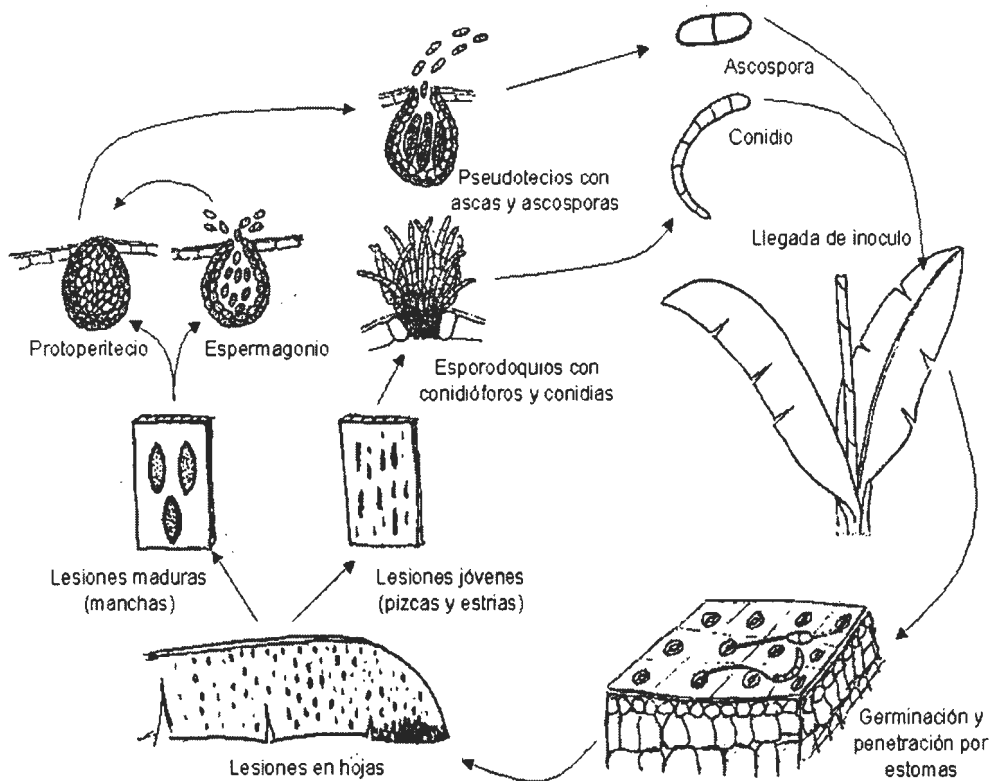


Figura 1.4. Ciclo de vida del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra de bananos y plátanos (*Musa* sp.).

1.1.1.4 Estado asexual

La morfología del estado asexual de *M. fijiensis*, conocida como *Pseudocercospora fijiensis*, es reconocida porque los conidios son hialinos, obclavados a cilíndricos, rectos o ligeramente curvos, 6 a 9 septos, delgados en el ápice (30 a 132 μm de longitud) y más anchos en la base (2.5 a 5 μm) con una cicatriz en el hilum basal del conidio (punto de unión entre el conidio y el conidióforo) (Meredith y Lawrence, 1969). Los conidióforos pueden emerger directamente por el estoma de manera

individual o en grupos, o bien pueden formarse a partir de células del estroma de color oscuro y son fácilmente vistos en el estado 2 de la enfermedad (Mülder y Stover, 1976). Los conidióforos, resultado de la reproducción asexual, son septados de 0 a 5 compartimentos y 16.5 a 62.5 mm de longitud por 4 a 7 mm de ancho. De un solo conidióforo pueden formarse cuatro conidios maduros (Meredith y Lawrence, 1969).

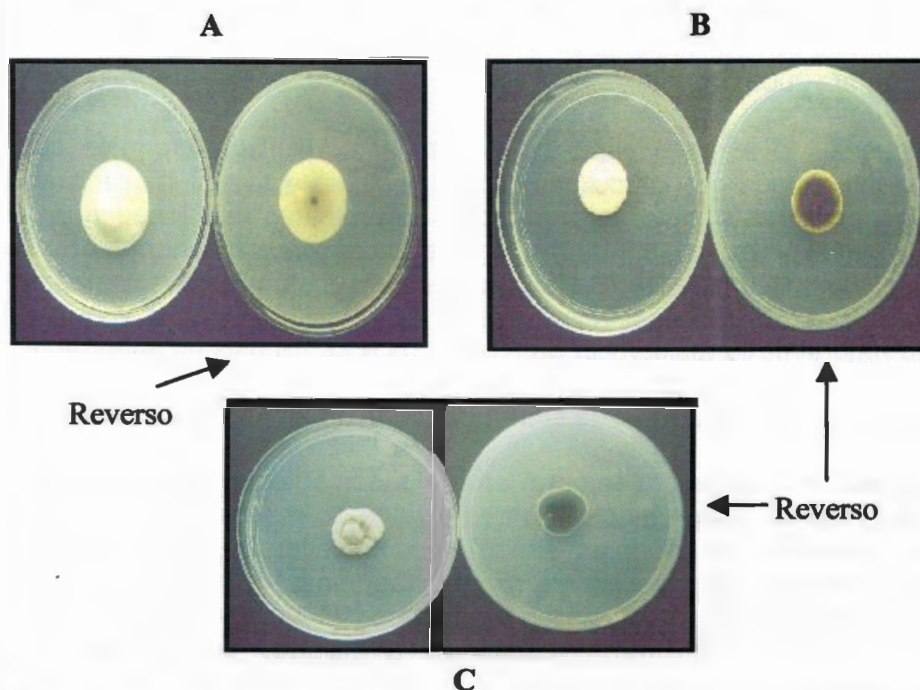


Figura 1.5. Características morfológicas de colonias de *Mycosphaerella fijiensis* de tres lugares de la región del Estado de Colima. A: Micelio aéreo blanco con apariencia algodonosa, redonda y mayor crecimiento; al reverso de la caja muestra color blanco, con un pequeño punto negro en el centro de la colonia. B: Micelio aéreo blanco, con apariencia algodonosa y crecimiento lento; al reverso de la caja muestra un color negro con los bordes blancos. C: Micelio compacto, gris rosado, sin apariencia algodonosa y de forma irregular (no circular); al reverso de la caja muestra un color negro con los bordes blancos.

1.1.1.5 Interacción *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp.

La clasificación de los genotipos de *Musa* spp. con relación a su resistencia a la enfermedad ha sido el resultado de la caracterización de

las interacciones planta-patógeno. Esta interacción inicia cuando las ascosporas o conidios de *M. fijiensis* llegan e inician la penetración a los espacios intercelulares del parénquima de la hoja, a través de los estomas (Beveraggi *et al.*, 1995). De acuerdo al resultado de esta interacción, los cultivares se han clasificado en tres categorías: los altamente resistentes que bloquean tempranamente la infección (interacciones incompatibles), los parcialmente resistentes que desarrollan los síntomas lentamente (interacciones compatibles), y los susceptibles que desarrollan los síntomas rápidamente (interacciones compatibles) (Ortiz y Vuylsteke, 1994; Lepoivre *et al.*, 2002).

La resistencia de algunas especies de *Musa* a *M. fijiensis* parece ser relacionada más a la postinfección, es decir la planta activa un mecanismo de defensa, manifestado por la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis (Lepoivre *et al.*, 1993) y algunas fitoalexinas (Quinones *et al.*, 2000), así como cambios en la estructura de sustancias preformadas (Hoss *et al.*, 2000). El conocimiento de la información genética sobre la herencia natural de la resistencia de musáceas a *M. fijiensis* es importante para poder desarrollar estrategias de mejora genética de la planta, orientadas hacia la resistencia de la enfermedad (Ortiz y Vuylsteke, 1994).

En la década de los noventa se obtuvieron híbridos euploides (tetraploides, triploides y diploides) que mostraron tres niveles de respuesta a Sigatoka negra; susceptibles (< 8 hojas sanas), poco susceptibles (8-10 hojas sanas) y moderadamente resistente (> 10 hojas sanas) (Ortiz y Vuylsteke, 1994). Posteriormente se obtuvieron los híbridos FHIA 1 (AAAA), FHIA 2 (AAAB), los cuales mostraron resistencia a aislados procedentes de distintas localidades de América Latina a tres temperaturas (22, 26 y 30°C), mientras que cultivares susceptibles Enano Gigante (AAA) y Falso Cuerno (ABB) fueron afectados por todos los aislados bajo las tres temperaturas, presentándose un mayor daño a 26°C (Romero y Sutton, 1997a), temperatura reportada como óptima para el desarrollo de la enfermedad en genotipos susceptibles (Jacome y Schuh, 1992).

Se menciona que la resistencia parcial a la enfermedad depende de por lo menos tres genes diferentes, un gen recesivo principal *bsr1* y dos alelos aditivos independientes *bsr1* (Ortiz y Vuylsteke, 1994). Por otra parte, se ha demostrado que *M. fijiensis* tiene gran variabilidad patogénica, ya que algunos aislados obtenidos de diferentes hospederos procedentes de varios países, fueron virulentos en ciertos hospederos y en otros no fueron virulentos como en Calcutta IV y T8, mientras que en algunos hospederos

todos los aislados fueron virulentos. También, se observó que los aislados procedentes de Papua, Nueva Guinea y de las Islas del Pacífico mostraron un amplio rango de variabilidad patogénica en los cultivares Calcutta, Paka y Pisang Lilin que son comúnmente usados como fuente de resistencia en los programas de mejoramiento genético (Fullerton y Olsen, 1995).

Las lesiones necróticas y cloróticas ocasionadas por *M. fijiensis* en el hospedero, tal como se observó en el cultivar Yangambi km 5 (Mouliom-Perfoura, 1999), sugiere la participación de una o varias fitotoxinas. Esto es fortalecido por los resultados del estudio sobre la actividad fitotóxica de extractos crudos de *M. fijiensis* sobre hojas de 7 cultivares con diferente nivel de resistencia, observándose que el cultivar Enano Gigante que es altamente susceptible, presentó la mayor sensibilidad a dichos extractos (Molina y Krausz, 1989), muy similar al daño que se observa en campo. La primera fitotoxina aislada de *M. fijiensis* conocida como fijiensina, es un compuesto aromático que sólo provoca lesiones necróticas en cultivares de banana, indicando con esto su especificidad (Upadhyay *et al.*, 1990).

Posteriormente, otros compuestos fueron aislados del extracto del hongo, siendo el más abundante y fitotóxico el 2,4,8-trihidroxitetralona, el cual induce lesiones necróticas a 5 µg/5 ml en menos de 12 h. Otros de los compuestos encontrados en menor cantidad fueron la juglona, el ácido 2-carboxi-3-hidroxicinámico, el ácido isochracínico, la hidroxiscitalona y algunas melaninas (Stierle *et al.*, 1991). Recientemente se estudiaron las interacciones entre los cultivares de *Musa*: Dominico Hartón, Cachaco y Yangambi km 5, y los metabolitos secundarios del patógeno: flaviolona, 2-hidroxijuglona, juglona y 2,4,8-trihidroxitetralona. Se detectó que en el cultivar Yangambi km 5 se induce una elevada actividad de amoniliasa de fenilalanina, la cual transforma la fenilalanina a ácido trans-cinámico, este es convertido rápidamente en lignina que se acumula junto con otras sustancias en la pared celular y posiblemente bloquean el crecimiento del hongo (Hoss *et al.*, 2000). Esto muestra que la planta induce mecanismos de defensa como una reacción de hipersensibilidad después del ataque del hongo, por lo que las fitotoxinas de *M. fijiensis* podrían servir como un determinante secundario de patogenicidad en cultivares altamente resistentes a la enfermedad y en consecuencia los prospectos para el escrutinio de cultivares de banano resistentes a Sigatoka negra son prometedores (Harelimana *et al.*, 1997).

1.1.1.6. Estrategias de control

La Sigatoka negra es controlada principalmente con la aplicación de fungicidas, ya que es la medida más viable y efectiva para reducir los daños de la enfermedad, aunque esta medida también es apoyada con algunas prácticas de cultivo como el deshoje, deshije, densidad de la plantación, drenaje, control de malezas y fertilización (Orozco-Santos, 1998). El uso excesivo de fungicidas ocasiona contaminación ambiental y problemas de salud humana (Stover, 1980; Henriques *et al.*, 1997); además se ha demostrado la pérdida de sensibilidad del hongo a fungicidas sistémicos del grupo de benzimidazoles como carbendazim y benomyl (Fullerton y Tracey, 1984) e incluso se ha comprobado que la resistencia a benomyl persiste aún después de que cesan las aplicaciones por períodos de 3 a 5 años.

También, se ha publicado que el hongo pierde la sensibilidad al fungicida sistémico propiconazol (triazol) cuando se aplica junto con benomyl (Romero y Sutton, 1998). Lo anterior indica que la resistencia del hongo a algunos fungicidas está ligada a su constitución genética, ya que se ha descrito que la resistencia al grupo químico de las estrobilurinas depende de la secuencia de nucleótidos del gen del citocromo b, correspondiente al aminoácido alanina en la posición 143 (Sierotzki *et al.*, 2000). Se ha observado que la alta virulencia de los aislados está correlacionada con la aplicación frecuente de fungicidas, de tal manera que aislados resistentes a benomyl, propiconazol y trifloxistrobin fueron más agresivos en plantas de banano inoculadas bajo condiciones de invernadero, que los aislados sensibles a estos fungicidas (Romero y Sutton 1997b; 1998; Chin *et al.*, 2001).

En resumen, la resistencia del patógeno a algunos fungicidas y el incremento en su virulencia, ha tenido como consecuencia que su control sea más complejo y costoso al incrementar el número de aplicaciones (Romero y Sutton, 1998); por esta razón, recientemente se ha utilizado como alternativa el sistema de preaviso biológico, que consiste en la detección oportuna de los síntomas en tres de las hojas más jóvenes de la planta, y detener el desarrollo de la enfermedad con el uso de fungicidas sistémicos y de contacto que tienen efecto curativo sobre los estadios tempranos del proceso de patogénesis del hongo, de tal manera que el número de aplicaciones se reduce al 31% (Pérez-Vicente *et al.*, 2000).

Otra alternativa es el uso de agentes de control biológico como el hongo *Trichoderma* spp., cuyo efecto se ha evaluado sobre el desarrollo de *M. fijiensis* en laboratorio y campo (Rebolledo-Domínguez, comunicación personal), así como también bacterias del género *Serratia* y *Bacillus* (Gonzalez *et al.*, 1996). Sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios debido a que no tiene un efecto similar de control como el de los fungicidas, pero tienen potencial para ser usados en las regiones donde existen poblaciones de *M. fijiensis* resistentes a fungicidas.

En la actualidad existen varios híbridos que se han desarrollado en algunos centros de investigación, como son los obtenidos por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) y por el Instituto Internacional de Agricultura Tropical, en Nigeria (IITA), por el Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo, en Francia (CIRAD-FLHOR). Estos materiales presentan cierta tolerancia a Sigatoka negra, sin embargo, el fruto es poco aceptado por el consumidor y por tanto afecta negativamente la demanda. Además, esta forma de mejoramiento tradicional requiere de mucho tiempo, de espacio y de una intensa labor de manejo (Vuylsteke *et al.*, 1997). Por ello, recientemente con la ayuda de disciplinas de la biotecnología moderna como la ingeniería genética se ha logrado transformar genéticamente plantas de banano a través del bombardeo de micropartículas (Sagí *et al.*, 1995) y por *Agrobacterium* (May *et al.*, 1995); lo que permitirá en un futuro obtener plantas de banano y plátano resistentes a la enfermedad mediante la transferencia de genes de resistencia a variedades de interés comercial.

1.1.1.6 Genómica

Recientemente, las técnicas moleculares han sido una herramienta indispensable en el estudio del genoma de *Mycosphaerella* spp. porque se han usado desde el diagnóstico de la presencia de *M. fijiensis* y *M. musicola* en hojas infectadas de plátano, utilizando como técnica la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica la región del espacio interno transcrito (ITS) del ADN ribosomal (ADNr) (Johanson y Jeger, 1993), hasta la determinación del polimorfismo del ADN basadas en la digestión e hibridación de ADN (polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción: RFLP) y la amplificación del ADN con iniciadores al azar (RAPD) o iniciadores específicos como los polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y microsatélites, entre otros. En relación con el polimorfismo genético, mediante los RFLP, se determinó la gran diversidad genética que existe entre las poblaciones de *M. fijiensis*,

M. fijiensis var. *difformis* J.L. Mulder y Stover y *Mycosphaerella musicola* J.L. Mulder y Stover de diferentes regiones geográficas (Sudeste Asiático, incluyendo Filipinas y Papua Nueva Guinea, Islas del Pacífico, África y América Latina). Los niveles más altos de diversidad genética se hallaron en las dos poblaciones del Sudeste Asiático (Carlier *et al.*, 1994), lo que concuerda con la hipótesis de que esta región es el centro de origen de *M. fijiensis* (Stover, 1978; Mourichon y Fullerton, 1990). Otros de los resultados sobresalientes fueron que *M. fijiensis* y *M. fijiensis* var. *difformis* no reflejaron una variación genética, por lo que se descarta que *M. fijiensis* var. *difformis*, sea una variedad como fue propuesto por Müller y Stover, (1976).

En otro estudio, se identificó un desequilibrio gamético en las poblaciones analizadas, indicando que existe una reproducción sexual al azar, así como un alto nivel de diversidad alélica de H: 0.25-0.59; también se determinó que la migración natural de *M. fijiensis* entre los continentes Africano y Americano es muy poco probable (Carlier *et al.*, 1996). De igual manera, con el uso de marcadores genéticos de microsatélites específicos para loci de poblaciones de *M. fijiensis* procedentes de México y Nigeria, permitieron concluir que la diversidad alélica dentro de cada región fue comparativamente baja, que todos los loci fueron polimórficos entre las dos poblaciones, excepto un alelo en un locus que fue común entre ambas regiones. Con base en que los aislados de Nigeria y México tienen diferentes haplotipos polimórficos se concluyó que no ha habido migración del patógeno entre estos continentes (Neu *et al.*, 1999). En otro estudio realizado por Müller *et al.* (1997), se determinó la diversidad genética a escalas macro y microgeográficas, entre una lesión, entre lesiones de una planta, entre plantas, entre diferentes cultivares y entre distintas localidades geográficas, demostrando que el estado sexual del hongo heterotálico representa una fuente importante para provocar un alto nivel de variación genética (Mourichon y Zapater, 1990).

Los marcadores genéticos también se han utilizado para determinar la relación filogenética entre *M. fijiensis*, *M. musicola*, *M. musae* (Speg.) Syd. y P. Syd., *Phaeoseptoria musae* Punith. y *Mycosphaerella eumusae* Crous y Mourichon presentes en las hojas de bananos y plátano, mediante el análisis de las secuencias de los ITS, de tal manera, que se ha confirmado que *M. eumusae* está más cercano a *M. fijiensis*, por lo que, se considera potencialmente un fitopatógeno de importancia (Carlier *et al.*, 2000). Por otra parte, con la finalidad de entender la interacción patógeno-hospedero, se ha desarrollado un sistema de transformación genética para *M. fijiensis*,

M. musicola y *M. eumusae*, incorporando el gen de la proteína verde fluorescente (GPF), con el propósito de estudiar el desplazamiento de los hongos dentro del hospedero (Balint-Kurti *et al.*, 2001).

Así mismo, se ha sugerido recientemente que *M. fijiensis* puede considerarse como modelo de estudio genético en la interacción planta-patógeno, porque es un organismo que cumple con las características que señala Martín *et al.* (2002): 1) que su estrategia de infección esté relacionada evolutivamente con la de otros patógenos, 2) que su tamaño de genoma sea relativamente pequeño, 3) que sea de interés económico, y 4) que sea relativamente bien estudiado y que se puedan realizar experimentos moleculares y de genética clásica. Por ello, actualmente, en el Laboratorio de Biotecnología Molecular del CICY se están realizando estudios para determinar el tamaño y el número de cromosomas de *Sigatoka* negra, se ha construido una biblioteca de tipo cromosoma artificial bacteriano (BAC), así como también se está trabajando en la obtención de un mapa genético y físico del hongo y la identificación molecular de genes expresados en la interacción *Musa* spp.-*M. fijiensis* (Andrew James comunicación personal). Aunado a esto, las herramientas comparativas de genómica funcional y proteómica podrían ser usadas para tener un mejor entendimiento del genoma del patógeno.

1.1.2 CONCLUSIONES

Los estudios, en el ámbito molecular, que se han realizado hasta la fecha en *M. fijiensis* son pocos. Existen muchos aspectos biológicos y genéticos de *M. fijiensis* como es el diálogo molecular entre *Musa* spp.-*M. fijiensis* que podrían ser entendidos utilizando nuevas herramientas moleculares y así lograr en un futuro un mejor control de la enfermedad. El estudio de la patogenicidad y de la composición de la estructura genética de las poblaciones de *M. fijiensis* permitirán en un futuro entender los mecanismos por los cuales ocurre la interacción planta-patógeno, los cambios que puedan surgir en determinado período y las posibles causas de la variación genética, así como también su comportamiento con su hospedero. La aplicación constante de fungicidas provoca la aparición de poblaciones resistentes a ciertos grupos químicos y daños al ambiente y a la salud humana, por lo que surge la necesidad de implementar nuevas estrategias de control. El uso de agentes de control biológico que permitan un control de *Sigatoka* negra, podría ser parte de programas de un manejo integrado de la enfermedad. Los híbridos podrían reunir requerimientos locales de los pequeños productores y lograr producir a un bajo costo

reemplazando cultivares susceptibles a la enfermedad. En la actualidad, se están desarrollando herramientas moleculares que permiten entender varios aspectos biológicos y genéticos de hongos fitopatógenos para lograr un mejor control de la enfermedad.

1.2 Mapeo en genomas de hongos fitopatógenos: Aplicaciones y perspectivas

Resumen. Los hongos fitopatógenos pueden provocar pérdidas económicas considerables en los cultivos agrícolas. El uso excesivo de productos químicos ocasiona problemas serios, como es la aparición de aislados tolerantes hacia algunos grupos químicos, la contaminación al ambiente y problemas de salud humana. Por lo tanto, surge la necesidad de implementar nuevas tecnologías moleculares para un mejor entendimiento y manejo del patógeno. Con este fin se han desarrollado mapas genéticos en algunos hongos fitopatógenos, además mediante el apoyo de los marcadores de ADN se ha podido identificar y etiquetar los genes deseables, como por ejemplo genes de avirulencia. Por otra parte, una de las prioridades de los mapas físicos es localizar e identificar la región donde reside algún gene en particular. El objetivo de la presente revisión es informar los avances que se han logrado sobre el mapeo de genomas de hongos fitopatógenos, sus principales ventajas y aplicaciones.

Palabras claves adicionales: Marcadores de ADN, genes de avirulencia, cariotipo electroforético, mapas genéticos, mapas físicos.

Abstract. Phytopathogenic fungi can cause economic losses in agriculture. The excessive use of chemical agents to control these pathogens is costly, and can lead to the development of fungicide tolerance of the pathogen as well as environmental contamination and risks to human health. The implementation of new molecular technologies will lead to a better understanding and more sustainable management of the pathogens. Genetic linkage maps have been developed for some phytopathogenic fungi. By means of the support of DNA markers it has been possible to map and identify genes, for example, avirulence genes. On the other hand, the priority of physical maps is to find and identify the place where some particular gene resides. The objective of the present review is to detail the advances that have been obtained in the mapping of genomes of phytopathogenic fungi, their main advantages and applications.

Additional key words: DNA markers, avirulence genes, electrophoretic karyotype, genetic map, physical map.

Artículo en prensa de la Revista Mexicana de Fitopatología.

1.2.1 Introducción

El desarrollo de la genética y la biología en el siglo pasado y en los últimos años ha generado importantes logros, como son: el redescubrimiento de las leyes de Mendel, la determinación del ADN como el material genético, el descubrimiento de la estructura de la doble hélice del ADN y sus aplicaciones, los análisis de ADN por medio de marcadores, la manipulación y clonación de fragmentos grandes de ADN y por último la obtención de la secuencia del ADN que puede ser convertido en información digital y almacenada en una computadora para su posterior análisis (Lander y Weinberg, 2000; Zhang y Wing, 1997). Los mapas genéticos y mapas físicos forman la base para numerosas investigaciones básicas y aplicadas, incluyendo estudios de la organización y evolución del genoma, clonación de genes blanco, comparaciones evolutivas entre especies y otras aplicaciones. Los mapas genéticos de genomas de hongos fitopatógenos se han construido con la ayuda de marcadores de ADN y recientemente con la información de secuencias genómicas, siendo su principal aplicación el mapeo de genes de avirulencia (*avr*).

Hoy en día, se han desarrollado mapas genéticos en varios hongos fitopatógenos (Cuadro 1), dentro de los cuales, los Ascomicetos son los más estudiados. Por otra parte, los mapas físicos se han iniciado a partir de la determinación del cariotipo electroforético, la construcción y caracterización de bibliotecas BAC (cromosoma bacteriano artificial), las cuales han permitido realizar estudios en genómica comparativa entre especies relacionadas y determinar la localización física de algún gene. El mapeo genético, el mapeo físico y la secuenciación de genomas podrían ayudar a elucidar la función de un gene, regulación del gene y su expresión bajo condiciones específicas (Peters *et al.*, 2003), siendo estas herramientas una prioridad en los proyectos de análisis de genomas. Con base en lo expuesto anteriormente, se plantea exponer en esta revisión los avances que se han logrado en hongos fitopatógenos sobre la construcción de mapas genéticos, el mapeo de genes, el mapeo físico y otras aplicaciones para estudiar y comprender el genoma de este tipo de patógenos.

1.2.1.1 Mapas genéticos

Los mapas genéticos ayudan a entender la estructura, función y evolución del genoma y pueden ser una herramienta importante para la identificación de genes de interés (Jurgenson *et al.*, 2002a). Los mapas genéticos

muestran la localización relativa de marcadores específicos de ADN a lo largo de los cromosomas. Cuanto más cercanos estén dos marcadores, es poco probable que durante un proceso de recombinación genética se separen y lo más probable es que se hereden juntos en una población segregante (Jones *et al.*, 1997).

En los últimos años, los polimorfismos son revelados por técnicas moleculares, tales como los marcadores RFLP (polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar), SSR (secuencias simples repetitivas) y AFLP (polimorfismos de la longitud de fragmentos amplificados), entre otras. Una característica que deben de tener este tipo de marcadores para ser utilizados en la construcción de un mapa genético, es que deben ser altamente polimórficos, es decir, deben existir formas alternativas (alelos) entre los padres para ser detectables entre los miembros de la progenie y que segreguen en una proporción 1:1. Para organismos haploides el análisis de ligamiento es uno de los métodos básicos e indispensables en la genética clásica (Jones *et al.*, 1997).

El ligamiento puede definir las distancias genéticas entre algunos genes o loci polimórficos existentes dentro del genoma, las cuales podrían ser reconocidas como diferencias en apariencia de longitudes de fragmentos de restricción o secuencias de nucleótidos en el locus alélico (Jones *et al.*, 1997 y Peters *et al.*, 2003). Un mapa genético determina las distancias entre dos puntos, la cual es una medida de la frecuencia de recombinación entre los dos puntos. Los mapas se miden en términos de centimorgans (cM). Dos marcadores están a 1.0 cM si están separados por una frecuencia de recombinación del 1% (o una recombinación en 100 eventos de meiosis). Para llevar a cabo la construcción de mapas genéticos de hongos fitopatógenos primeramente se lleva a cabo una selección de aislados compatibles sexualmente y principalmente que sean genéticamente diversos y / o que porten genes de interés (por ejemplo: genes de avirulencia y genes de virulencia). Por ejemplo, en organismos haploides en una cruce entre aislados genéticamente distantes, las poblaciones segregantes o poblaciones F₁ que se obtengan podrían ser ricas en marcadores polimórficos, los cuales podrían ser usados para generar un mapa genético detallado del genoma (Jurgenson *et al.*, 2002a).

1.2.1.2 Mapas físicos

Un mapa físico es un conjunto ordenado de fragmentos de ADN, dentro del cual las distancias son expresadas en unidades de distancias físicas (pares de bases). Generalmente comprende un conjunto ordenado de insertos de clonas grandes ordenados tales como bibliotecas BAC. Los mapas físicos pueden proporcionar información independientemente de la información genética, pero son de mayor utilidad si son ligados a marcadores genéticamente mapeados y aún más útiles si son integrados con los datos de la secuencia del genoma (Meyer *et al.*, 2004).

Un mapa físico completo podría facilitar la clonación de genes por varios métodos y sentar las bases para anclar y ordenar ESTs (secuencia expresada etiquetada). El desarrollo reciente de la manipulación de fragmentos grandes de ADN y su clonación en levadura (biblioteca YAC) o bacteria (biblioteca BAC), son herramientas poderosas para la generación de mapas físicos. Por otra parte, las características del genoma en términos del número y tamaño de cromosomas obtenidos por separación en geles de campo pulsante (PFGE) son conocidas como el cariotipo electroforético. Con la ayuda de la técnica de PFGE se puede realizar la separación de ADN de tamaño cromosomal (Zolan, 1995; Mills y McCluskey, 1990). La metodología de PFGE se ha aplicado para mapear genes sobre un cromosoma en particular y correlacionarlos con algún grupo ó grupos de ligamiento (GL) (Luo *et al.*, 2005).

En casos donde una sonda de un gene está disponible, el análisis tipo Southern Blot puede ser usado para identificar el cromosoma en el cual reside el gene (Mills y McCluskey, 1990). En varios hongos fitopatógenos se han determinado sus cariotipos y los tamaños de genomas se han determinado con precisión (Cuadro 1), generando información importante sobre la variación en el número y tamaños de los cromosomas, dentro y entre especies, así como también en las aplicaciones en el mapeo de genes y su clonación (Zolan, 1995). Una aplicación basada en el desarrollo de un mapa genético, es la correlación con bandas (cromosomas) específicas en el cariotipo electroforético mediante la hibridación usando sondas específicas de marcadores encontrados en un GL en particular (Zolan, 1995) y así poder correlacionar el mapa genético con el mapa físico dando la facilidad de identificar marcadores de ADN cercanos a un gene de interés (<2 cM).

Los mapas físicos proveen virtualmente un número ilimitado de marcadores de ADN de una región específica de cualquier cromosoma, lo que permite el etiquetado de genes, su aislamiento y su manipulación. Los mapas físicos también proveen una fuente importante de información para realizar estudios en la estructura molecular del genoma, su organización y evolución, la regulación de un gene y sus interacciones. El interés mayor es de desarrollar mapas genéticos densos y culminar en mapas físicos, en donde los genes o marcadores están localizados en una posición precisa de secuencia nucleotídica. Como resultado, la definición de la secuencia y función de un gene puede realizarse durante un periodo de 4 años y en algunos casos dependiendo del tamaño del genoma se requerirá de más tiempo.

1.2.1.3 Mapeo genético y mapeo físico de genomas de hongos fitopatógenos

A continuación se describen los avances de investigación obtenidos a la fecha sobre la construcción de mapas genéticos, la determinación del cariotipo electroforético, la determinación del tamaño de genoma, y la construcción y caracterización de bibliotecas BAC en hongos fitopatógenos (Fig. 1). Se mencionan en algunos casos los resultados sobre la comparación entre mapas genéticos y mapas físicos, las aplicaciones hacia el mapeo y clonación de genes de avirulencia y estudios de genómica comparativa mediante el análisis de bibliotecas BAC.

Cuadro 1.1. Características de mapas genéticos y mapas físicos desarrollados en hongos fitopatógenos.

Nombre científico (Hospedero)	Marcadores moleculares	No.	Gene o locus mapeado	No. segregantes	GL	cM	Cariotipo electroforético (Mb)	Tamaño del genoma	Fuentes
<u>Ascomycetos</u>									
<i>Ascochyta rabiei</i> (1)* (Garbanzo)	SSR, DAF	50	No mapeado	77	10	261.4	No estimado	No estimado	Lichtenzveig <i>et al.</i> , 2002
<i>Ascochyta rabiei</i> (2) (Garbanzo)	AFLP, RAPD, SSR, SCAR	126	<i>MAT</i>	96	28	1271	10-14	20.5-30.5	Phan <i>et al.</i> , 2003; Akamatsu y Peever 2005
<i>Blumeria graminis</i> (1) (Trigo)	RFLP	31	<i>Avr1a10</i> , <i>Avr1c</i> y <i>Avr1h</i>	80	7	~326	No estimado	No estimado	Christiansen y Giese, 1990
<i>Blumeria graminis</i> (2) (Trigo)	AFLP, RFLP	359	<i>MAT</i> , <i>Avr02</i> , <i>Avr03</i> , <i>Avr06</i> , <i>Avr07</i> , <i>Avr10</i> , <i>Avr022</i> y <i>Avr1k1</i>	81	34	2114	7 a 8	100-160	Pedersen <i>et al.</i> , 2002a; 2002b
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> (Maíz)	RFLP	125	<i>Tox1</i> , <i>MAT</i>	91	16	1500	15 a 16	35	Tzeng <i>et al.</i> , 1992
<i>Cochliobolus sativus</i> (Cebada y Trigo)	AFLP, RFLP	134	<i>MAT</i> , <i>VHv1</i>	103	27	849	15	33	Zhong <i>et al.</i> , 2002
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Tomate)	AFLP	83	<i>Avr-3</i>	32	23	76	10 a 15	50	Teunissen <i>et al.</i> , 2003
<i>Gibberella moniliformis</i> (Maíz)	RFLP	636	<i>Mat A</i> , <i>Ste1</i> , <i>FUM1</i>	121	12	145	12	46	Jurgenson <i>et al.</i> , 2002
<i>Gibberella zeae</i> (1) (Maíz y Trigo)	AFLP	1070	<i>PIG1</i> , <i>PER1</i> , <i>DON</i> , <i>NIV</i> , <i>TRI5</i>	111	9	1300	9	40	Xu y Leslie, 1996; Jurgenson <i>et al.</i> , 2002
<i>Gibberella zeae</i> (2) (Maíz y Trigo)	AFLP, STS	235	<i>HygR</i> , <i>nitM</i> , <i>nyt1</i>	111	9	1234	4	36	Gale <i>et al.</i> , 2005
<i>Leptosphaeria maculans</i> (1) (Colza, Repollo, Coliflor, Rábano)	AFLP	56	<i>Avr1m1</i>	100	14	336	No estimado	No estimado	Pongam <i>et al.</i> , 1998

<i>Leptosphaeria maculans</i> (2) (Colza, Repollo, Coliflor, Rábano)	AFLP, RAPD	160	MAT, HS	58	21	1160	16	34	Cozijnsen <i>et al.</i> , 2000
<i>Leptosphaeria maculans</i> (3) (Colza, Repollo, Coliflor, Rábano)	AFLP, RAPD, rep-PCR, ISSR	125	MAT, 1 Avr	301	18	116. 8	No estimado	No estimado	Attard <i>et al.</i> , 2002
<i>Magnaporthe grisea</i> † (Arroz)	RFLP, RAPD, SSR	226	MAT, AVR1- CO39	61	7	900	6	30	Nitta <i>et al.</i> , 1997; Kaye <i>et al.</i> , 2003; Zhu <i>et al.</i> , 1997
<i>Magnaporthe grisea</i> † (Arroz)	RFLP, RAPD,	65	MAT, AvrPik, AvrPiz y AvrPiz-t	60	7-8	525. 8	7-8	No estimado	Luo <i>et al.</i> , 2005
<i>Mycosphaerella fijiensis</i> (Banano y Plátano)	AFLP, SSR	280	No mapeado	51	25	1073	8 a 13	35	Manzo-Sánchez <i>et al.</i> , 2005; Rodríguez-García <i>et al.</i> , en preparación
<i>Mycosphaerella graminicola</i> (Trigo)	AFLP, RAPD	280	MAT, AVR	68	23	1216	17 a 18	38	Kema <i>et al.</i> , 2002
<i>Pyrenophora teres</i> f sp. <i>teres</i> (Cebada)	AFLP	108	MAT, Avr	78	15	909	6	23	Lai <i>et al.</i> , 2005
<u>Basidiomicetos</u>									
<i>Puccinia graminis</i> (Trigo)	AFLP, RAPD	57	AvrTU, AvrT6, AvrT8a, AvrT9, AvrT10, AvrT21, AvrT28, AvrT30	81	7	525	No estimado	No estimado	Zambino <i>et al.</i> , 2000
<i>Heterobasidion annosum</i> (Pinos)	AFLP	358	Genes inter esteriles S y P	102	39	2252	10	25	Lind <i>et al.</i> , 2005; Anderson <i>et al.</i> , 1993
<u>Deuteromicetos</u>									
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Frijol)	AFLP	167	No mapeado	108	34	1923 .3	9 a 12	No estimado	Luna-Martínez <i>et al.</i> , 2007; O'Sullivan <i>et al.</i> , 1998

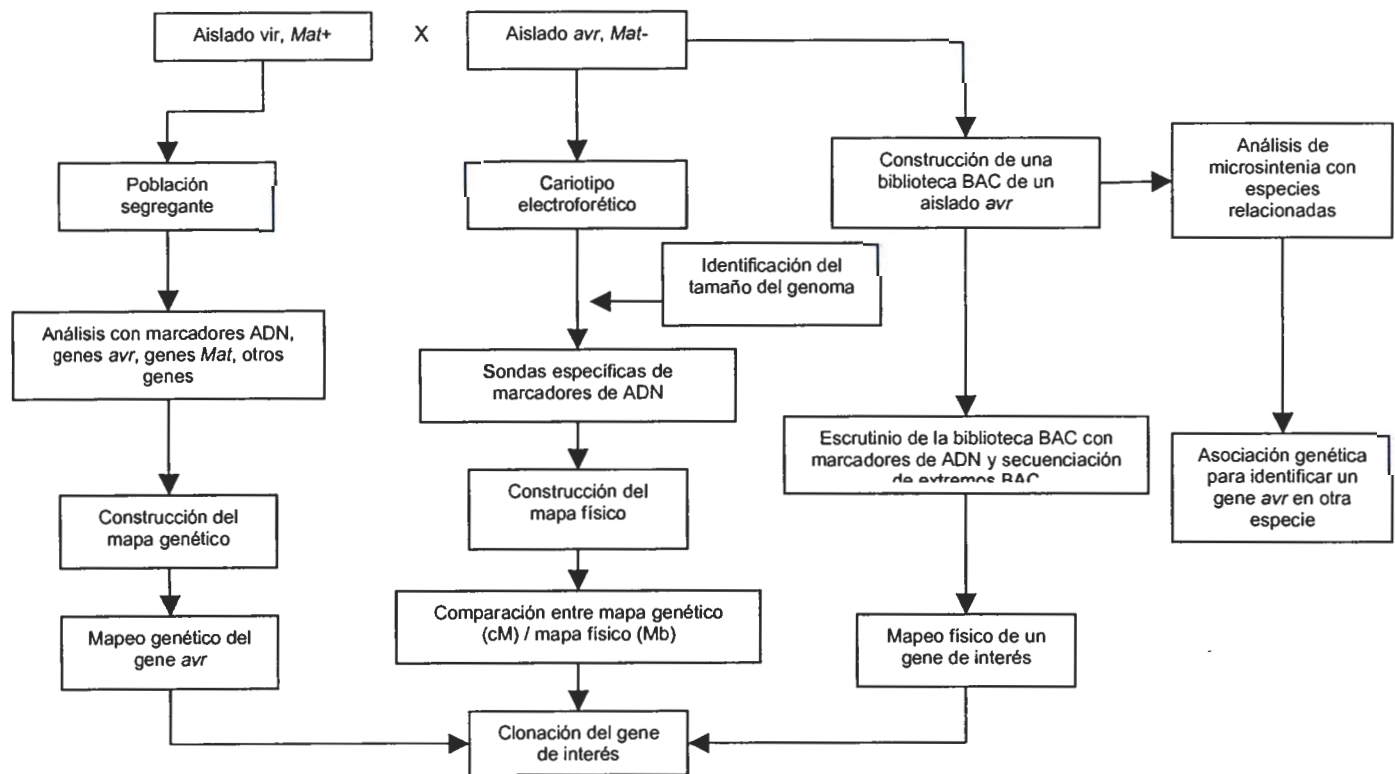


Figura 1.6. Esquema gráfico de los principales pasos requeridos para el mapeo genético y mapeo físico en genomas de hongos fitopatógeno.

1.2.1.4 *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*

B. graminis f. sp. *hordei*, es un parasito biotrófico obligado, y el agente causal del oídium o moho de la cebada. Los primeros trabajos sobre el mapeo genético de genes de avirulencia en este organismo iniciaron con el trabajo hecho por Christiansen y Giese (1990). Ellos analizaron la segregación de 31 marcadores RFLP y tres genes de avirulencia (*Avr₁₀*, *Avr_{1c}* y *Avr_{1h}*) en una población obtenida por la cruce entre el aislado C15 aislado de Dinamarca en 1964 y TY4, los cuales difieren en el nivel de avirulencia en 8 de los 14 loci de avirulencia. Estos análisis arrojaron un mapa de 7 GL con una longitud de ~326 cM, en dos GL se encontraron los genes de avirulencia.

En otro estudio posterior, se analizó una población segregante de una cruce entre los aislados C15 y JEH31 (aislado de Dinamarca en 1972), difiriendo en siete genes de avirulencia. Estos fueron analizados con marcadores AFLP, RFLP, así como también el locus MAT y 7 genes de avirulencia (*Avr₂*, *Avr₃*, *Avr₆*, *Avr₇*, *Avr₁₀*, *Avr₂₂* y *Avr_{k1}*). Un total de 359 loci fueron mapeados y todos los genes de avirulencia. Con estos resultados se pudo construir un mapa genético de 34 GL cubriendo una longitud total de 2114 cM. Un gene de avirulencia resultó fuertemente ligado a algunos marcadores moleculares, lo que puede permitir la clonación basada en el mapeo (Pedersen *et al.*, 2002a).

Por lo anterior, Pedersen *et al.* (2002b), llevaron a cabo la construcción de una biblioteca BAC del aislado C15. Su análisis mostró un alto contenido de secuencias repetitivas, dificultando la construcción de "contigs" (clonas BAC traslapadas). Sin embargo, la biblioteca BAC permitió identificar el tamaño del genoma de *B. graminis*, el cual fue de 100-160 Mb. Así como también, se construyeron dos contigs, los cuales contenían a dos loci de avirulencia (*Avr₆* y *Avr₂₂*). Se desarrollaron marcadores de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) de secuencias de extremos BAC para ligar los contigs al mapa genético previamente reportado por Pedersen *et al.*, (2002a).

Posteriormente, se utilizaron dos contigs BAC de *B. graminis* para llevar a cabo estudios de microsintenia con *Neurospora crassa* Shear y Dodge y *A. fumigatus*. Un dato importante de estas comparaciones es que algunos genes ortólogos de *N. crassa* fueron ortólogos de genes de *B. graminis*. La biblioteca BAC en combinación con los mapas genéticos proveen

herramientas invaluable para el aislamiento de genes de avirulencia de *B. graminis* y para el estudio de sintenia con otros hongos.

1.2.1.5 *Didymella rabiei* (Kovachevski) (anamorfo: *Ascochyta rabiei* Pass. Labr.)

El agente causal de la rabia del garbanzo, el hongo necrotrófico *D. rabiei* provoca una de las más importantes enfermedades del garbanzo a escala mundial. Escasa información esta disponible sobre los factores genéticos involucrados en la interacción hospedero-patógeno. Lichtenzveig *et al.* (2002) desarrollaron un mapa genético a partir del análisis genético de la progenie obtenida de la cruce entre un aislado de *A. rabiei* originario de Estados Unidos (ATCC76501) y otro de Siria (AA13), difiriendo en su agresividad. Cincuenta marcadores fueron mapeados, 36 fueron marcadores DAF (huellas génicas de ADN amplificado) y 14 marcadores SSR. El mapa genético estuvo comprendido por diez GL y tuvo una longitud de 261.4 cM.

Sin embargo, en un estudio posterior Phan *et al.* (2003) desarrollan otro mapa genético de este hongo cruzando el aislado ATCC76502 MAT 2 de Estados Unidos con VIC0013 MAT 1 de Australia. Ellos emplearon 126 marcadores de ADN de los cuales 69 fueron marcadores RAPD, 46 fueron marcadores AFLP y 10 fueron marcadores SSR y una SCAR. Se caracterizaron dieciocho GL mayores y 10 GL menores y se logró mapear el locus MAT (de apareamiento). El mapa tuvo una longitud de 1271 cM y un promedio de distancia entre marcadores de 15.1 cM. Desafortunadamente, los dos mapas no pueden ser integrados ya que solamente dos marcadores SSR fueron comunes para ambos mapas.

Por otra parte, Akamatsu y Peever (2005), reportaron el cariotipo electroforético de *A. rabiei*. Usando una colección mundial de *A. rabiei* y *Ascochyta* spp. incluyendo *A. fabae*, *A. lentis*, *A. pisi* y *A. viciae-villosae*. El cariotipo electroforético de 45 aislados de *A. rabiei* originarios de 19 países revelaron 10-14 cromosomas y un tamaño estimado del genoma de 20.5 a 30.5 Mb.

1.2.1.6 *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder and H.N. Hansen

El hongo imperfecto *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es el agente causal de la marchitez del tomate (*Lycopersicon esculentum*) el ciclo sexual de este patógeno no se ha observado en campo. Los aislados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* son clasificados dentro de razas fisiológicas y grupos vegetativamente compatibles (VCGs). Tres razas fisiológicas son distinguidas por su virulencia diferencial sobre cultivares de tomate conteniendo diferentes genes de resistencia dominantes. Por lo anterior, para mapear genes de avirulencia en este hongo, una población generada a partir de cruza parasexuales fue desarrollada de dos aislados, uno de la raza 1 (aislado Fo1004), conteniendo el gene de avirulencia A1 y el otro de la raza 3 (aislado Fo1029), conteniendo A3. Ambos aislados fueron transformados con el gene de la resistencia a fleomicina (ble) y el gene de la resistencia a higromicina (hph), respectivamente. Se llevo a cabo la fusión de protoplastos y la progenie obtenida fue seleccionada por la presencia de ambos genes de la resistencia a los antibióticos mencionados.

Un total de 32 productos fusionados fueron obtenidos; los resultados mostraron el intercambio de ADN parental, y la recombinación y segregación de los genes de avirulencia (Teunissen *et al.*, 2002). Se emplearon marcadores AFLP con una técnica modificada, la cual combina un oligonucleótido específico al retotransposon *Foxy* (el cual esta presente y es altamente variable dentro del genoma de *Fusarium*) con adaptadores de oligonucleótidos standard. Esta metodología fue utilizada para construir un mapa genético de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Los análisis de ligamiento revelaron 23 GL usando 83 marcadores *Foxy*-AFLP (Teunissen *et al.*, 2003). A la fecha éste es el único mapa creado en base a la fusión de protoplastos de un hongo fitopatógeno.

1.2.1.7 *Gibberella moniliforme* Wineland (anamorfo: *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg)

El primer trabajo sobre la construcción de un mapa genético en *G. moniliforme* fue realizado por Xu y Leslie (1996). Estos autores analizaron marcadores RFLP, dos genes auxotróficos (*arg1*, *nic1*), el MAT (*matA+* / *matA-*), la esterilidad femenina (*ste1*), la característica de espora muerta (*Sk*) y un gene gobernando la producción de la micotoxina fumosina B1

(*fum1*). Usaron el aislado A00015 (produce *fum1*, *matA*⁺, *Skk*, *arg1*, *nic1* y *ste1*) y lo cruzaron con A04643 (no produce *fum1*, *matA*⁻, *Sks*) Los análisis arrojaron 12 GL correspondiendo a los 12 cromosomas que fueron previamente identificados mediante el cariotipo electroforético (Xu *et al.*, 1995).

Los GL y los cromosomas fueron correlacionados mediante la técnica de Southern blot empleando como sondas marcadores RFLP de cada uno de los GL. Sin embargo, uno de los problemas que presentó este mapa es su alto contenido de huecos dentro de los GL, haciendo esto difícil para localizar rutinariamente con precisión algunos genes importantes biológicamente. Por lo tanto, usando la misma población segregante Jurgenson *et al.* (2002b), expandieron el mismo mapa descrito por Xu *et al.* (1995), adicionándole 486 marcadores AFLP. El mapa genético resultante tuvo un promedio de intervalo entre marcadores de 3.9 cM y aproximadamente 21 kb / cM. Por lo tanto, se pudo identificar marcadores AFLP en menos de 1 unidad de mapa del locus MAT y 2.5 cM del locus de *sk*; mientras que ocho marcadores AFLP estuvieron dentro de 8.5 cM del locus *fum1*. Estos resultados podrían ser útiles para la localización y clonación de genes de interés en este hongo.

1.2.1.8 *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch (anamorfo: *Fusarium graminearum* Schwabe)

El hongo ascomiceto homotálico *F. graminearum*, provoca varios tipos de enfermedades en diferentes cultivos agrícolas. Por ejemplo, en el trigo y la cebada causa la pudrición de la corona y la costra basal, en maíz provoca la corona del tallo, corona de la espiga y en clavel la putrefacción de la corona. Pero uno de los daños más importantes es cuando ocasiona la reducción de la calidad del grano de cebada, ya que los granos cosechados frecuentemente están contaminados con las toxinas nivalenol (NIV), deoxinivalenol (DON) y zearalenona. Jurgenson *et al.* (2002a), construyeron un mapa genético a partir del análisis de una cruce obtenida de dos mutantes complementarios que no utilizan nitrato (*nit*) de *G. zeae*, el aislado R-5470 originario del Japón (línea 6 que produce NIV) y Z-3639 de Kansas (línea 7 que produce DON). La progenie fue analizada mediante marcadores AFLP, dando como resultado un total de 468 marcadores AFLP, estos fueron mapeados sobre nueve GL, obteniéndose una longitud total del mapa de 1300 cM con un promedio de intervalo de 2.8 unidades de mapa entre loci. Uno de los resultados mostró que algunos loci que

gobiernan la cantidad y tipo de toxina (DON o NIV) fueron localizados en los GL IV y I respectivamente. Así como también, se demostró que el locus que gobierna el tipo de tricoteceno (DON o NIV) cosegregó con el gene *TR15* (codifica para una tricodieno sintasa).

Posteriormente, en otro estudio con la ayuda de este mapa se pudo identificar loci asociados con la patogenicidad y agresividad de *G. zeae* en trigo (Cumagun *et al.*, 2004). Los resultados mostraron que la progenie segregó cualitativamente (61:38) para la patogenicidad : no patogenicidad, respectivamente. Las 61 progenie que fueron patogénicas a trigo, mostraron que la reinducción de síntomas de la enfermedad (agresividad) varió cuantitativamente. Enseguida se pudo determinar que dos reproducibles QTLs (siglas en ingles: Quantitative Trait Loci) para la agresividad fueron detectados reproduciblemente en el GL I del mapa genético. Con base en estos resultados ahora puede ser posible buscar en las interacciones cultivar x aislado, analizando la agresividad de aislados NIV y DON sobre variedades de trigo altamente resistentes. Así, el mapeo de los QTL de esas características de *G. zeae* podría identificar genes involucrados en las interacciones específicas entre el hospedero y el patógeno y provee una información básica necesaria para el manejo del hospedero y poblaciones del patógeno dentro del agroecosistema de trigo (Cumagun *et al.*, 2004).

En cambio, en un estudio reciente Gale *et al.* (2005), construyeron un nuevo mapa genético para validar la información generada de la secuenciación del genoma de *F. graminearum*. Ellos utilizaron el aislado PH-1 (aislado de Michigan) que fue usado para secuenciar el genoma y lo cruzaron con el aislado 00-676 (aislado de Minesota). Se obtuvo un total de 111 ascosporas, las cuales fueron analizadas para la segregación de 235 loci. Se determinó por estudio del cariotipo citológico un número de 4 cromosomas. Los marcadores genéticos consistieron de sitios de secuencias etiquetadas (STS), AFLP y otros marcadores. Un mapa genético fue construido con nueve GL, cubriendo una longitud de 1234 cM y anclando 99.83% de la secuencia del genoma. Los nueve GL y 22 secuencias de correlación ancladas de la secuencia pudieron ser ensamblados dentro de los cuatro cromosomas.

1.2.1.9 *Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces. & De Not. (anamorfo: *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desmaz.)

El hongo ascomiceto *L. maculans* es el agente causal de la enfermedad conocida como podredumbre seca o pata negra de la colza (*Brassica napus* L.), la cual provoca pérdidas de más del 90% de la producción. En este patógeno se han realizado diferentes estudios para el mapeo genético y físico de su genoma. Tres mapas genéticos han sido reportados por varios grupos (Attard *et al.*, 2002; Cozijnsen *et al.*, 2000; Pongam *et al.*, 1998), pero ninguno pudo ser integrado con algún otro. El primer mapa fue llevado a cabo utilizando dos aislados, PHW1245 avirulento y PHW1223 virulento sobre *B. napus* cv. Major. Se emplearon marcadores AFLP y se analizó el locus de avirulencia (*a1m1*). El mapa genético arrojó nueve GL mayores y cinco GL pequeños menores conformados con al menos 3 marcadores cada uno.

Dos marcadores AFLP fueron ligados al locus *alm1*, los cuales estaban a una longitud de 3.1 y 8.1 cM. Estos datos nos indican que el gene de avirulencia esta controlado por un solo gene (Pongam *et al.*, 1998). En cambio, en otro estudio se llevó a cabo el análisis genético de la cruce entre el aislado C13 avirulento y M1 virulento sobre *B. juncea*. La población segregante fue estudiada usando marcadores AFLP, RAPD, el locus MAT y un locus confiriendo especificidad del hospedero (HS) por la habilidad de formar lesiones en *B. juncea*. Los resultados presentaron un mapa genético de 21 GL, con cinco GL pequeños y una longitud de 1520 cM.

Los resultados mediante PFGE mostraron que cada aislado parental tuvo 16 cromosomas y un tamaño de genoma de 33.5 Mb (Cozijnsen *et al.*, 2000). Por lo tanto, el mapa genético y físico podría ser extremadamente útil como una base para futuros estudios de genética y genómica funcional de este hongo. Posteriormente, otro grupo de investigación realizó una cruce entre el aislado a.2 (Mat+, *AvrLm1*) y el aislado H5 (Mat-, *avrLm1*) aislados de *B. napus*. El mapa genético fue obtenido mediante el análisis de marcadores RAPD, ISSR (secuencias simples repetidas internas), AFLP y rep-PCR, estos produjeron 301 marcadores ligados, definiendo 18 GL de más de cinco marcadores cada uno de ellos.

El locus *AvrLm1* fue localizado dentro de un GL de 116.8 cM de longitud, compuesto de 14 marcadores, de los cuales 7 están estrechamente agrupados alrededor del locus *AvrLm1*. Estos marcadores fueron transformados dentro de regiones amplificadas de secuencias

caracterizadas (SCARs). Esto con la finalidad de realizar el proceso hacia la clonación de *AvrLm1* usando la metodología de clonación posicional, mediante el análisis de una biblioteca BAC hecha de un aislado *AvrLm1*. Sin embargo, se observó que el locus blanco correspondió a un área deficiente de recombinación, la cual fue determinada mediante el análisis en cruza obtenidas *in vitro*. Como una alternativa, se eligió incrementar el número de eventos meióticos, por lo tanto, se analizaron aislados virulentos y avirulentos provenientes de diferentes campos en el cultivar que porta el gene de resistencia *Rlm-1*. Los resultados mostraron que existe un alto nivel de conservación de la región del genoma del locus *AvrLm1* dentro de los aislados provenientes de distintos campos (Attard *et al.*, 2002).

1.2.1.10 *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr. (anamorfo: *Pyricularia oryzae*)

El hongo ascomiceto *M. grisea* es el responsable de causar la enfermedad de la mancha foliar del arroz, una de las más perjudiciales de este cultivo. Este hongo se ha considerado como un organismo modelo para estudios fitopatológicos. Se ha demostrado que *M. grisea* tiene un genoma pequeño (30 Mb) y cuenta con siete cromosomas (Romao y Hamer, 1992; Skinner *et al.*, 1993; Sweigard *et al.*, 1993). Otra característica que presenta *M. grisea* es que esta genéticamente relacionado a otros hongos modelos no patógenos como son *N. crassa* y *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter.

En décadas pasadas, varios grupos de investigación llevaron a cabo estudios intensos en los cuales resultaron varios mapas genéticos de este hongo, se emplearon diferentes tipos de marcadores como son marcadores RFLP, marcadores RAPD, marcadores SSR, secuencias de telómeros, la secuencia de ADN repetitivo nombrada "MGR586" y genes de avirulencia (Nitta *et al.*, 1997; Smith y Leong, 1994; Farman y Leong, 1995; Romao y Hamer, 1992; Sweigard *et al.* 1993; Kaye *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2005; Dloh *et al.*, 2000). Uno de los logros obtenidos fue que se pudo integrar la información generada de dos mapas genéticos y se obtuvieron siete GL correspondientes a los siete cromosomas del hongo (Nitta *et al.*, 1997). Por consiguiente, el mapa genético obtenido del análisis de la progenie de la cruce entre Guy11 (MAT1-2) con 2539 (MAT1-1) reportado por Nitta *et al.* (1997), es el que ha servido para estudios posteriores como el mapeo de genes de avirulencia.

El desarrollo de los mapas genéticos en *M. grisea* ha facilitado el mapeo de distintos genes de avirulencia y con la ayuda de la metodología de caminata sobre cromosoma varios genes Avr han sido clonados (PWL2, AVR1-CO39, AVR-Pita y ACE1) (Sweigard *et al.* 1995; Orbach *et al.*, 2000; Farman y Leon, 1998; Bohnert *et al.*, 2004). Recientemente Luo *et al.* (2005), construyeron un nuevo mapa genético de la cruce entre el aislado 84R-62B (MAT1-1) con Y93-245c-2 (MAT1-2). Se pudo determinar las localizaciones cromosómicas de tres genes de avirulencia (*AvrPik*, *AvrPiz* y *AvrPiz-t*). Empleando marcadores RAPD y RFLP que hibridan diferencialmente con los cromosomas de los dos aislados parentales, se asignaron mediante análisis de Southern blots a los cromosomas 3 y 7 respectivamente los dos GL que contienen a los genes *AvrPiz* y *AvrPiz-t*. El gene *AvrPik* está localizado sobre el cromosoma del tamaño de 1.6 Mb en 84R-62B, lo que sugiere que los tres genes de avirulencia residen sobre diferentes cromosomas.

Por otra parte, en otro estudio se analizaron algunos clones de una biblioteca BAC del aislado 70-15 y fueron ensamblados dentro de 188 contigs cubriendo todo el genoma del hongo. Ciento veintitrés de esos "contigs" fueron anclados al mapa genético reportado por Nitta *et al.* (1997), empleando marcadores RFLP (Zhu *et al.*, 1999).

El cromosoma 7 (con un tamaño de 4.2 Mb) es hoy en día la porción del genoma más estudiada (Mitchell *et al.*, 2003). La importancia de su estudio es que este cromosoma contiene el locus MAT (*mat* a o α) así como también 20 marcadores mapeados. Por lo anterior, Zhu *et al.* (1999), construyeron un mapa físico cubriendo >95% del cromosoma 7 de *M. grisea* usando una biblioteca BAC, obteniendo una importante correlación entre el mapa genético y el mapa físico de este cromosoma (Mitchell *et al.*, 2003). En un estudio realizado para determinar el nivel de sintenia (regiones de un juego de genes ortólogos) de una biblioteca BAC (aislado 4224.7.8) del cromosoma de *M. grisea* y la información de las secuencias de los genomas de *N. crassa*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, se encontró que una región fue sinténica a una porción del genoma de *N. crassa*, en cambio no hubo sintenia con *C. albicans* y *S. cerevisiae*.

La identificación de estas regiones conteniendo genes altamente conservados a través de dos géneros que han evolucionado independientemente induce muchas preguntas biológicas, como la función

y la identidad de esos genes (Hamer *et al.*, 2001). Un estudio importante realizado en *M. grisea* es la secuenciación de su genoma, usando el aislado 70-15 (Dean *et al.*, 2005). El análisis de la secuencia del genoma demostró que presenta un gran y diverso grupo de proteínas secretoras, posee una extensa familia de proteínas G receptoras, varios nuevos genes asociados a la virulencia y una gran cantidad de enzimas involucradas en el metabolismo secundario (Dean *et al.*, 2005). Siendo este el primer análisis detallado del genoma de un hongo fitopatógeno.

1.2.1.11 Otros hongos fitopatógenos

Tzeng *et al.* (1992), reportaron el uso de marcadores RFLP y 4 marcadores fenotípicos (resistencia a cicloheximida, el locus MAT, la producción de la toxina *Tox1* y nivel de patogenicidad) para construir el mapa genético de *Cochliobolus heterostrophus*, el agente causal del destrozo de la hoja de maíz usando el aislado Hm540 (*tox1*, MAT1-1 de Carolina del Norte) y el aislado B30.A3.R45 (*TOX1*, *alb1*; *CyhR*, MAT1-2). El cariotipo electroforético fue determinado en los padres y en algunos individuos de la progenie, se usaron sondas para detectar marcadores RFLP que hibridaran con algún cromosoma. Quince a 16 cromosomas fueron detectados, 126 marcadores fueron asignados a cromosomas específicos y el ligamiento entre 120 marcadores fue confirmado. Varios marcadores RFLP fueron ligados al locus *Tox1*.

Posteriormente, en otro estudio un mapa genético y el cariotipo electroforético fue desarrollado en *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechs. Ex Dastur causante de varias enfermedades (mancha borrosa y putrefacción común de la raíz) de cebada y trigo. Usaron el aislado ND90Pr, el cual presenta alta virulencia al cv. Bowman de cebada y lo cruzaron con ND5883 que presenta un bajo nivel de virulencia. Se analizaron en la progenie obtenida marcadores AFLP, RFLP, el locus MAT y un gen condicionando alta virulencia a cebada cv. Bowman (VHv1). Los resultados arrojaron un mapa genético comprendido por 27 GL cubriendo una distancia de 1329 cM y se determinó un número de 15 cromosomas, estimándose un tamaño del genoma de 33 Mb. El gen de virulencia VHv1 co-segregó con seis marcadores AFLP que fueron mapeados sobre un GL. Por medio de la hibridación usando dos a tres marcadores RFLP y AFLP de cada uno de los GL, 25 de los 27 GL fueron asignados a cromosomas específicos (Zhong *et al.*, 2002).

Otro de los patógenos estudiados a nivel de su genoma fue *Pyrenophora teres* f. *teres*, causante de la mancha en red de cebada. Se construyó un mapa genético y se ha obtenido el cariotipo electroforético. Ciento ocho marcadores AFLP fueron analizados para construir el mapa genético, el cual consistió de 15 GL y una longitud de 909 cM. El análisis del cariotipo electroforético reveló un mínimo de 6 cromosomas con un tamaño del genoma de 23 Mb. Cada uno de los individuos de la población fueron inoculados en cada una de las cuatro líneas de cebada, las cuales muestran una respuesta diferencial a los aislados usados como padres (Lai *et al.*, 2005).

Por último, el primer mapa genético reportado de un basidiomiceto fue hecho por Zambino *et al.* (2000), analizando una población F₂ de *Puccinia graminis* Pers., agente causal de la rodera del vástago de trigo. Se mapearon 17 marcadores RAPD, 35 marcadores AFLP y 8 genes de avirulencia y se logró construir un mapa genético compuesto por 7 GL con una longitud de 525 cM.

Otro basidiomiceto estudiado fue *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *sensu lato* (s.l.), agente causal de la putrefacción de la raíz en coníferas, siendo el patógeno más devastador del hemisferio Norte. Un mapa genético fue construido de la cruce entre dos aislados compatibles de los grupos íter estériles S y P originarios de Norte América. Una progenie de 102 individuos fue obtenida y analizada con 358 marcadores AFLP. Los análisis de ligamiento mostraron 19 GL, conteniendo seis o más marcadores, los cuales cubrieron una longitud de 1468 cM; sin embargo, otros 70 marcadores AFLP fueron asignados a pequeños GL. Esos marcadores formaron otros 20 GL; por lo tanto, la longitud total del mapa fue de 2252 cM. Los loci para los dos genes íter estériles (S y P) fueron localizados en el mapa. Mientras que la segregación del locus MAT fue analizado por retro- cruces entre la progenie con sus padres (Lind *et al.*, 2005a). Sin embargo, el locus MAT no pudo ser colocado en el mapa. Posteriormente, se mapearon QTLs para la patogenicidad sobre *Pinus silvestris*. Los análisis determinaron un QTL sobre el GL 15 y un QTL en el GL 20. Estos QTLs podrían ser identificados y caracterizados en estudios posteriores (Lind *et al.*, 2005b).

1.2.1.12 Investigaciones realizadas en México

En México existen dos instituciones que han realizado proyectos sobre el mapeo de genomas de hongos fitopatógenos. Una de éstas es el CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán), Mérida, en donde se ha estudiado al hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, el cual causa la enfermedad conocida como Sigatoka negra del plátano (*Musa* spp.). se ha determinado el cariotipo electroforético de aislados provenientes de los estados de Veracruz, Tabasco, Colima, Chiapas y Yucatán observándose un número de 8 a 13 cromosomas y el tamaño estimado del genoma fue de 35 Mb (Rodríguez *et al.*, 2006). Por otra parte, se construyó y caracterizó una biblioteca BAC de un aislado proveniente del estado de Veracruz, la cual está conformada por 1,920 clonas, con un promedio de inserto de 90 kb (Canto-Canche *et al.*, in press).

La construcción de un mapa genético de este patógeno se llevó a cabo con la colaboración del Dr. Jean Carlier del CIRAD (siglas en francés: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), Francia y la Dra. June Simpson del CINVSTAV (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN), Irapuato. Se llevó a cabo un estudio preliminar del análisis de una progenie F₁ generada de la cruce entre el aislado CIRAD86 (*mat+* originario de Camerún, el cual fue usado para secuenciar el genoma de este hongo) con el aislado CIRAD139A (*mat-* originario de Colombia); luego esta población fue analizada con marcadores AFLP y marcadores SSR. Apoyándose en los resultados obtenidos de la segregación de los marcadores se generó el mapa genético que consistió de 25 GL formados por 5 o más marcadores. El mapa estuvo conformado por 270 marcadores, de los cuales 257 fueron marcadores AFLP y 13 fueron marcadores SSR, el mapa tuvo una longitud de 1083 cM (Manzo-Sánchez *et al.*, 2005). Estos datos concuerdan con el mapa genético de *Mycosphaerella graminicola*, un hongo emparentado genéticamente a *M. fijiensis*. *M. graminicola* es agente causal de la mancha foliar del trigo, en donde se cruzaron el aislado IPO232 (MAT1-1, aislado de Holanda) que es virulento sobre Veranopolis, Kavazva y Shafir con IPO94269 (MAT1-2, aislado de Holanda), el cual es avirulento a los cultivares antes mencionados; en este estudio se reportaron 23 GL y con una longitud del mapa de 1216 cM (Kema *et al.*, 2002). En un futuro podríamos mapear el locus MAT, examinar en una base de datos de 40,000 EST originados de *M. fijiensis* la presencia de SSR y desarrollar nuevos marcadores EST-SSR para su posterior mapeo y por último, utilizar

la información que pronto será generada de la secuencia del genoma para localizar genes de interés.

Otro de los objetivos del grupo es la clonación del locus MAT de *M. fijiensis*. Por lo tanto, se llevó a cabo la clonación del gen ADN liasa, el cual se ha demostrado que está cercano al locus MAT en varios hongos. Un fragmento de este gene fue amplificado con oligonucleótidos degenerados, clonado y secuenciado. Usando una estrategia de caminata sobre cromosoma y anclando sobre el gene de la ADN liasa, fue obtenida una región de 7 kb de largo, que se localiza hacia la caja HMG incluido en el idiomorfo MAT-2. En otro aislado, se obtuvo una región de 5 kb, la cual incluye al idiomorfo MAT-1. La anotación de los genes está en progreso actualmente (Conde-Ferrández *et al.*, 2005).

La otra institución nacional con proyectos de mapeo de genomas de hongos fitopatógenos es el CINVESTAV Unidad Irapuato, en donde se ha llevado a cabo el análisis del mapeo genético de genes de avirulencia del Deuteromiceto *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus), agente causal de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Dos aislados de origen mexicano que difieren en al menos dos genes de avirulencia fueron cruzados para obtener una población F₁. Se obtuvo un mapa genético fue obtenido mediante el análisis de 167 marcadores AFLP; el mapa presentó una longitud de 1923.3 cM y estuvo conformado por 34 GL, con una distancia promedio entre marcadores de 11.5 cM y una distancia máxima de 39 cM. Además, se pudo determinar que los genes de avirulencia (*Avrcl-Mex* y *Avrcl-To*) en los aislados usados como padres segregan dentro de la progenie en forma independiente y en una proporción de 1:1. Actualmente este es el primer mapa genético que se reporta para alguna especie de *Colletotrichum* (Luna-Martínez *et al.*, 2005).

1.2.2 Conclusiones

En los últimos años la búsqueda de soluciones a los problemas causados por hongos fitopatógenos en los últimos años se ha encaminado hacia el mapeo físico y genético de sus genomas. El mapeo de genomas de hongos fitopatógenos se ha enfocado hacia la búsqueda de genes de interés, tales como los genes de avirulencia, siendo hasta la fecha, pocos los que se han clonado. El mapeo físico nos ha permitido poder entender la composición física del genoma, como es la determinación del tamaño y

número de cromosomas, así como también el tamaño del genoma. La genómica comparativa es una herramienta poderosa que nos permite entender los aspectos evolutivos entre los genomas de organismos de la misma especie y entre diferentes especies. Por último, uno de los logros obtenidos recientemente es el análisis de la secuencia completa del genoma de varios hongos fitopatógenos, el cual nos permitirá conocer toda la maquinaria con que cuenta el patógeno para poder invadir y provocar daños a su hospedero. Como se puede apreciar en esta revisión, son relativamente pocos los estudios que se han llevado a cabo sobre el mapeo de genomas de hongos fitopatógenos, estando los ascomicetos como los más estudiados. Por lo tanto, surge la necesidad de implementar este tipo de metodologías para poder entender con más detalle el genoma de otros hongos fitopatógenos que son potencialmente dañinos a cultivos de interés comercial en México.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca otorgada a G. Manzo-Sánchez (128982) para sus estudios de Doctorado y por el financiamiento al proyecto titulado Mapeo físico y genético del patógeno de plátano *Mycosphaerella fijiensis* (37602-B).

HIPOTESIS

Con base a lo anterior se plantea la hipótesis de que el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es capaz de cruzarse bajo condiciones *in vitro* entre aislados sexualmente compatibles, para desarrollar poblaciones F₁ con la finalidad de lograr seleccionar una población para analizarla con marcadores moleculares con el fin de desarrollar un mapa genético de ligamiento e incluir el análisis de la segregación del locus MAT

OBJETIVOS

Objetivo general

Para dar respuesta a la hipótesis propuesta se planteo el objetivo de realizar cruzas bajo condiciones *in vitro* entre aislados del hongo *Mycosphaerella fijiensis* procedentes de diferentes regiones geográficas y obtenidos de diferentes cultivares de banano con la finalidad para desarrollar poblaciones F₁, lograr seleccionar una de estas y finalmente analizarla mediante marcadores moleculares para desarrollar un mapa genético de ligamiento.

Objetivos específicos

1. Cruzar bajo condiciones *in vitro* aislados de *M. fijiensis* procedentes de diferentes países y de diferentes cultivares de banano.
2. Desarrollar poblaciones F₁ a partir de la cruce entre dos aislados de *M. fijiensis* obtenidos de diferentes regiones geográficas.
3. Analizar una población F₁ empleando marcadores los AFLP y SSR, así como también el locus MAT.
4. Desarrollar un mapa genético de ligamiento de *M. fijiensis* a partir del análisis de la segregación de marcadores moleculares y el locus MAT.
5. Estimar el tamaño del genoma de *M. fijiensis* con base en los datos del análisis del mapeo.

REFERENCIAS

- Akamatsu, H. and Peever, T.L.** 2005. Molecular karyotypes of the phytopathogenic fungus *Ascochyta rabiei* and related legume-infecting *Ascochyta* spp. Fungal Genetics Newsletter S52:204.
- Anderson, M., Kasuga, T., and Mitchelson, K.** 1993. A partial physical karyotype of *Heterobasidion annosum*. In: Johansson, M., Stenlind, J. (Eds.), Eight International Conference on Root and Butt Rots. Uppsala, Sweden.
- Attard, A., Gout, L., Gourgues, M., Kühn, M.-L., Schmit, J., Laroche, S., Ansan-Melayah, D., Billault, A., Cattolico, L., Balesdent, M.-H., and Rouxel, T.** 2002. Analysis of molecular markers genetically linked to the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene *avrlm1* in field populations indicates a highly conserved event leading to virulence on *rlm1* genotypes. Molecular Plant-Microbe Interactions 15:672-682.
- Balint-Kurti, P.J., May, G.D., and Churchill, A.C.L.** 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.
- Beveraggi, A., Mourichon, X., et Sallé, G.** 1995. Étude comparée des premières étapes de l'infection chez des bananiers sensibles et résistants infectés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladie des raies noires. Canadian Journal of Botany 73:1328-1337.
- Bohnert, H.U., Fudal, I., Diou, W., Tharreau, D., Notteghem, J.L., and Lebrun, M.H.** 2004. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. Plant Cell 16:2499-2513.
- Carlier, J., Fouré, E., Gauhl, F., Jones, D.R., Lepoivre, P., Mourichon, X., Pasberg-Gauhl, C., and Romero, R.A.** 2000. Fungal diseases of the foliage. pp. 37-79 In: D.R. Jones (ed.). Disease of Banana, Abacá and Enset. CABI Publishing. Wallingford, Oxon, UK. 544 p.

- Carlier, J., Lebrun, M.H., Zapater, M. Dubois, C., and Mourichon, X.** 1996. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 5:499-510.
- Carlier, J., Mourichon, X., Gonzalez-de León, D., Zapater, M., and Lebrun, M.H.** 1994. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. *Phytopathology* 84:751-756.
- Chin, K.M., Wirz, M., and Laird, D.** 2001. Sensivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Disease* 85:1264-1270.
- Christiansen, S.K., and Giese, H.** 1990. Genetic analysis of the obligate parasitic barley powdery mildew fungus based on RFLP and virulence loci. *Theoretical and Applied Genetics* 79:705-712.
- Clay, K., and Kover, P.** 1996. Evolution and stasis in plant pathogen associations. *Ecology* 77:997-1003.
- Conde-Ferrández, L., Canto-Canché, B., Waalkjwik, C., Kema, G., James, A. and Abeln E.** 2005. Cloning of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*. *Memorias VI Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos. Morelia, Michoacán, México. Resumen, p. 77.*
- Cozijnsen, A.J., Popa, K.M., Rolls, B.D., Purwantara, A. and Howlett, B.J.** 2000. Genome analysis of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*: mapping mating type and host specificity loci. *Molecular Plant Pathology* 1:293-302.
- Craenen, K.,** 1998. Black sigatoka disease of banana and plantain. A Reference Manual. International Institute of Tropical Agriculture. Ibadan, Nigeria. 58 p.
- Cumagun, C.J.R., Bowden, R.L., Jurgenson, J.E., Leslie, J.F., and Miedaner, T.** 2004. Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* 94:520-526.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R. Pan, H., Read, N.**

D., Lee, Y.-H. Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcel, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E., and Birren, B.W. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434:980-986.

Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J.L., Orbach, M., and Lebrun, M.H. 2000. Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13:217-227.

Farman, M.L. and Leong, S.A. 1995. Genetic and physical mapping of telomeres in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. Genetics 140:479-492.

Farman, M.L. and Leong, S.A. 1998. Chromosome walking to the AVR-CO39 avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: Discrepancy between the physical and genetic maps. Genetics 150:1049-1058.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2001. Production and trade yearbook for 2000. Vol. 15. FAO, Rome.

Fouré, E. 1985. Black Leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), Study of the Symptoms and Stages of the Disease in Gabon. IRFA, Paris, France. 23 p.

Fullerton, R.A., and Olsen, T.L. 1995. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black sigatoka in banana and plantain. New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science 23:39-48.

Fullerton, R.A., and Tracey, G.M. 1984. Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazim in the pacific islands. Tropical Agriculture 61:133-136.

Gale, L.R., Bryant, J.D., Calvo, S., Giese, H., Katan, T., O'Donnell, K., Suga, H., Taga, M., Usgaard, T.R., Ward, T.J. and Kistler, H.C. 2005. Chromosome complement of the fungal pathogen *Fusarium*

graminearum based on genetic and physical mapping and cytological observations. *Genetics* 171:985-1001.

- Gonzalez, R., Bustamente, E., Shannon, P., Okumoto, S., y Leandro, G.** 1996. Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Manejo Integrado de Plagas* 40:12-16.
- Hamer, L., Pan, H., Adachi, K., Orbach, M.J., Page, A., Ramamurthy, L., and Woessner, J.P.** 2001. Regions of microsynteny in *Magnaporthe grisea* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 33:137-143.
- Harelimana, G., Lepoivre, P., Jijakli, H., and Mourichon, X.** 1997. Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black Leaf Streak. *Euphytica*, 96:125-128.
- Henriques, W., Jeffers, R.D., Leacher, T.E. Jr., and Kendall, R.J.** 1997. Agrochemical use on banana plantations in Latin America: perspectives on ecological risk. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:91-99.
- Hoss, R., Helbig, J., and Bochow, H.** 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* 148:387-394.
- Jacome, L.H., and Schuh, W.** 1992. Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology* 82:515-520.
- Johanson, A., and Jeger, M.J.** 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycological Research* 97:670-674.
- Jones, N., Ougham, H., and Thomas, H.** 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist* 137:165-177.

- Jurgenson, J.E., Bowden, R.L., Zeller, K.A., Leslie, J.F., Alexandra, N.J., and Plattner, R.D.** 2002a. A genetic map of *Gibberella zea* (*Fusarium graminearum*). *Genetics* 160:1451-1460.
- Jurgenson, J.E., Zeller, K.A., and Leslie, J.F.** 2002b. Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Applied and Environmental Microbiology* 68:1972-1979.
- Kaye, C., Milazzo, J., Rozenfeld, S., Lebrun, M.-H., and Tharreau, D.** 2003. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. *Fungal Genetics and Biology* 40:207-214.
- Kema, G.H.J., Goodwin, S.B., Hamza, S., Verstappen, E.C.P., Cavaletto, J.R., Van der Lee, T.A.J., de Weerd, M., Bonants, P.J.M., and Waalwijk, C.** 2002. A combined amplified fragment length polymorphism and randomly amplified polymorphism DNA genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* leaf blotch pathogen of wheat. *Genetics* 161:1497-1505.
- Lai, Z., Steffenson, B.J., Faris, J.D., Cartwright, R.D., Webster, R.K., Weiland, J.J., and Friesen, T.L.** 2005. Identification and mapping of *Pyrenophora teres* f. *teres* genes conferring avirulence on barley. *Fungal Genetics Newsletter* S52:125.
- Lander, E.S., and Weinberg, R.A.** 2000. Genomics: Journey to the center of biology. *Science* 287:1777-1782.
- Lepoivre, P., Acuna, P., and Riveros, A.S.** 1993. Screening procedure for improving resistance to banana black leaf streak disease. pp. 213-220. In: J. Ganry (ed.). *Breeding Bananas for Resistance to Disease and Pests*. CIRAD/INIBAP, Montpellier, France. 393 p.
- Lepoivre, P., Busogoro, J.P., El Hadrami, A., Carlier, J., Harelimana, G., Mourichon, X., Panis, B., Stella Riveros, A., Roux, N., Sallé, G., Strosse, H., and Swenen, R.** 2002. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* (black leaf streak disease) interactions. In: *Proceedings of the 2nd International Workshop on Mycosphaerella fijiensis leaf spot diseases of bananas*. INIBAP. CORBANA. CATIE, San José, Costa Rica, 20-23 May, 2002. 317 p.

- Lichtenzweig, J., Winter, P., Abbo, S., Shtienberg, D., Kaiser, W.J., and Kahl, G.** 2002. Toward the first linkage map of the *Didymella rabiei* genome. *Phytoparasitica* 30:467-472.
- Lind, M., Olson, A., and Stenlid, J.**, 2005a. An AFLP-markers based genetic linkage map of *Heterobasidion annosum* locating intersterility genes. *Fungal Genetics and Biology* 42:519-527.
- Lind, M., Olson, A., and Stenlid, J.**, 2005b. QTLs for pathogenicity on *Pinus silvestris* located in a *Heterobasidion annosum* genetic linkage map. *Fungal Genetics Newsletter* S52:127.
- Luna-Martínez, F., Rodríguez-Guerra, R., Victoria-Campos, M., Simpson-Williamson, J.** 2005. Primer mapa de ligamiento de *Colletotrichum lindemuthianum* basado en marcadores AFLP y genes de avirulencia. *Memorias VI Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos. Morelia, Michoacán, México. Resumen*, p. 141.
- Luo, C.-O., Yin, L.-F., Koyanagi, S., Farman, M.L., Kusaba, M. and Yaegashi, H.** 2005. Genetic mapping and chromosomal assignment of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *AvrPik*, *AvrPiz*, and *AvrPiz-t* controlling cultivar specificity on rice. *Phytopathology* 95:640-647.
- Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M., y Guzmán-González, S.** 2001. Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-centro de México y su desarrollo en medios líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:66-71.
- Manzo-Sánchez, G., Zapater, M.-F., Simpson, J., James, A., y Carlier, J.** 2005. Obtención de poblaciones F_1 y construcción de un mapa genético de *Mycosphaerella fijiensis* usando marcadores AFLP y SSR. *Memorias VI Congreso sobre Biología Molecular y Celular de Hongos. Morelia, Michoacán, México. Resumen*, p. 142.
- Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M., and Sutton, T.B.** 2003. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87:208-222.
- Martin, S.L., Blackmon, B.P., Rajagopalan, R., Houfek, T.D., Sceeles,**

- R.G., Denn, S.O., Mitchell, T.K., Brown, D.E., Wing, R.A., and Dean, R.A.** 2002. MaganaportheDB: a federal solution for integrating physical and genetic map data with BAC end derived sequence for the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nucleic Acids Research* 30:121-124.
- May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J., and Arntzen, Ch.J.** 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technology* 13:486-492.
- Meredith, D.S., and Lawrence, J.S.** 1969. Black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society* 52:459-476.
- Meyer, B.C., Scalabrin, S. and Morgante, M.** 2004. Mapping and sequencing complex genomes: let's get physical!. *Nature* 5:578-588.
- Mills, D., and McCluskey, K.** 1990. Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3:351-3576.
- Mitchell, T.K., Thon, M.R., Jeong, J.-S., Brown, D., Deng, J. and Dean, R.A.** 2003. The rice blast pathosystem as a case study for the development of new tools and raw materials for genome analysis of fungal plant pathogens. *New Phytologist* 159:53-61.
- Molina, G.C., and Krausz, J.P.** 1989. A phytotoxic activity in extracts of broth culture of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet var. *difformis* and its use to evaluate host resistance to black sigatoka. *Plant Disease* 73:142-143.
- Mouliom-Perfoura, A.** 1999. First observation of the breakdown of high resistant in Yangambi km 5 (*Musa* sp.) to the black leaf streak disease in Cameroon. *Plant Disease* 83:78.
- Mourichon, X., and Fullerton, R.A.** 1990. Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C. fijiensis*), respectively agents of sigatoka

disease and black leaf streak disease in bananas and plantains. *Fruits* 45:213-218.

- Mourichon, X., and Zapater, M.F.** 1990. Obtention *in vitro* du stade *Mycosphaerella fijiensis*, forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. *Fruits* 45:553-557.
- Mülder, J.L., and Holliday, M.** 1974. *Mycosphaerella fijiensis*. CMI Descriptions of Pathogenic fungi and bacteria No. 413. Kew, Surrey, UK.
- Mülder, J.L., and Stover, R.H.** 1976. *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. *Transactions of the British Mycological Society* 67:77-82.
- Müller, R., Pasberg-Gauhl, C., Gauhl, F., Ramser, J., and Kahl, G.** 1997. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Phytopathology* 145:25-30.
- Neu, C., Kaemmer, D., Kahl, G., Fisches, D., and Weising, K.** 1999. Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 8:513-525.
- Nitta, N., Farman, M.L., and Leong, S.A.** 1997. Genome organization of *Magnaporthe grisea*: integration of genetic maps, clustering of transposable elements and identification of genome duplications and rearrangements. *Theoretical and Applied Genetics* 95:20-32.
- Orbach, M.J., Farrall, L., Sweigard, J.A., Chumley F.G., and Valent, B.** 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2019-2032.
- Orozco-Santos, M.** 1998. Manejo Integrado de la Sigatoka Negra del Plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo Experimental Tecomán. Folleto Técnico No. 1. División Agrícola. Tecomán, Colima, México. 95 p.
- Orozco-Santos, M., Farías-Larios, J., Manzo-Sánchez, G., and Guzmán-González, S.** 2000. Black sigatoka in Mexico. *InfoMusa* 10:33-37.

- Ortiz, R., and Vuylsteke, D.** 1994. Inheritance of black sigatoka disease resistance in plantain-banana (*Musa* spp.) hybrids. *Theoretical and Applied Genetic* 89:146-152.
- Pedersen, C., Rasmussen, S.W., and Giese, H.** 2002a. A genetic map of *Blumeria graminis* based on functional genes, avirulence genes, and molecular markers. *Fungal Genetics and Biology* 35:235-246.
- Pedersen, C., Wu, B., and Giese, H.** 2002b. A *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* BAC library – contig building and microsynteny studies. *Current Genetics* 42:103-113.
- Pérez-Vicente, L., Mauri-Mollera, F., Hernández-Mancilla, A., Abreu-Antúnez, E., y Porras-González, A.** 2000. Epidemiología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en Cuba. I. Pronóstico Bioclimático de los Tratamientos de Fungicidas en Bananos (*Musa acuminata* AAA). *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:15-26.
- Peters, J.L., Cnudde, F., and Gerats, T.** 2003. Forward genetics and map-based cloning approaches. *TRENDS in Plant Science* 8:484-491.
- Phan, H.T.T., Ford, R., and Taylor, P.W.J.** 2003. Mapping the mating type locus of *Ascochyta rabiei*, the causal agent of ascochyta of chickpea. *Molecular Plant Pathology* 4:373-781.
- Pongam, P., Osborn, T.C., and Williams, P.H.** 1998. Genetic analysis and identification of Amplified Fragment Length Polymorphic markers linked to the alm1 avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 88:1068-1072.
- Quinones, W., Escobar, G. Echeverri, F., Torres, F., Rosero, Y., Arango, V., Cordana, G., and Gallego, A.** 2000. Synthesis and antifungal activity of *Musa* phytoalexins and structural analogs. *Molecules* 5:978-980.
- Rhodes, P.L.** 1964. A new disease in Fiji. *Commonwealth Phytopathological News* 10:38-41.

- Rodríguez, C.M., Raigosa-Flores, N., Conde-Ferrández, L., Peraza-Echeverría, L., Canto-Canché B., Espadas-Manrique C. and A. James-Kay.** Variation in electrophoretic karyotype between Mexican isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. Canadian Journal of Plant Pathology 28: 236-241.
- Romao, J., and Hamer, J.E.** 1992. Genetic organization of a repeated DNA sequence family in the rice blast fungus. Proceeding of the National Academic of Science of USA 89:5316-5320.
- Romero, R.R., and Sutton, T.B.** 1997a. Reaction of four genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. Plant Disease 81:1139-1142.
- Romero, R.R., and Sutton, T.B.** 1997b. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black sigatoka of bananas, to propiconazole. Phytopathology 87:96-100.
- Romero, R.R., and Sutton, T.B.** 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. Plant Disease 82:931-934.
- Sági, L. Panis, B., Remy, S., Schoofs, H., De Smet, K., Swennen, R., and Cammue, B.** 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. Bio/Technology 13:481-485.
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., and Gisi, U.** 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. Pest Management Science 56:833-841.
- Simmonds, N.W., and Shepherd, K.** 1955. Taxonomy and origins of cultivated bananas. Journal of the Linnean Society of London Botany 55:302-312.
- Skinner, D.Z., Budde, A.D., Farman, M.L., Smith, J.R, Leung, H., and Leong, S.A.** 1993. Genome organization of *Maganaporthe grisea*: genetic map, electrophoretic karyotype, and occurrence of repeated DNAs. Theoretical and Applied Genetics 87:545-557.

- Smith, J.R., and Leong, S.A.** 1994. Mapping of a *Magnaporthe grisea* locus affecting rice (*Oryza sativa*) cultivar specificity. Theoretical and Applied Genetics 88:901-908.
- Stierle, A., Upadhyay, R., Hershenthorn, J., Strobel, G.A., and Molina, G.** 1991. The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black sigatoka disease of bananas and plantains. Experientia 47:853-858.
- Stover, R.H.** 1978. Distribution and probable origin of *Mycosphaerella fijiensis* in southeast Asia. Tropical Agriculture (Trinidad) 55:65-68.
- Stover, R.H.** 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. Plant Disease 64: 750-756.
- Stover, R.H., and Simmonds, N.W.** 1987. Bananas (Third edition), Longman Scientific and Technical. New York, USA. 468 p.
- Sweigard, J.A., Valent, B., Orbach, M.J., Walter, A.M., Rafalski, A. and Chumley, F.G.** 1993. Genetic map of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* (n = 7). Pages 3.112-3.115 in: Genetic maps. S.J. O'Brien, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Teunessien, H.A.S., Rep, M., Houterman, P.M., Cornelissen, B.J.C. and Haring, M.A.** 2003. Construction of a mitotic linkage map of *Fusarium oxysporum* based on *Foxy*-AFLP. Molecular Genetics and Genomics 269:215-226.
- Teunissen, H.A.S., Verkooijen, J., Cornelissen, B.J.C., and Haring, M.A.** 2002. Genetic exchange of avirulence and extensive karyotype rearrangements in parasexual recombinations of *Fusarium oxysporum*. Molecular Genetics and Genomics 268:298-310.
- Tzeng, T.-H., Lyngholm, L.K., Ford, C.F., and Bronson, C.R.** 1992. A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. Genetics 130:81-96.

- Upadhyay, R.K., Strobel, G.A., Coval, S.J., and Clardy, J.** 1990. Fijiensin, the first phytotoxin from *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease. *Experientia* 47:982.
- Vuylsteke, D., Ortiz, R., Ferris, R.S.B., and Crouch, J.H.** 1997. Plantain improvement. *Plant Breeding Reviews* 14:267-320.
- Xu, J.-R., and Leslie, J.F.** 1996. A genetic map of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*). *Genetics* 143:175-189.
- Xu, J.-R., Yan, K., Dickman, M.B., and Leslie, J.F.** 1995. Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Leseola*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:74-84.
- Zambino, P.J., Kubelik, A.R., and Szabo, L.J.** 2000. Gene action and linkage of avirulence genes to DNA markers in the rust fungus *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 90:819-826.
- Zhang, H.-B. and Wing, R.A.** 1997. Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Molecular Biology* 35:115-127.
- Zhong, S., Steffenson, B.J., Martinez, J.P., and Ciuffetti, L.M.** 2002. A molecular genetic map and electrophoretic karyotype of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15:481-992.
- Zhu, H., Blackmon, B.P., Sasinowski, M. and Dean, R.A.** 1999. Physical map and organization of chromosome 7 in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Genome Research* 9:739-750.
- Zolan, M.E.** 1995. Chromosome-length polymorphism in fungi. *Microbiological Reviews* 59:686-698

CAPITULO 2

Materiales y métodos

2.1 Aislados de *Mycosphaerella fijiensis* y cruzas *in vitro*

Los aislados monoascospóricos de *M. fijiensis* que se utilizaron como padres, son procedentes de África (Camerún), Asia y el Pacífico (Filipinas y Tonga) y de América Latina (Colombia y México).

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología y Genética de las Interacciones Planta-Patógenos del CIRAD. El trabajo se realizó durante el período comprendido del mes de Octubre de 2003 al mes de Abril de 2004. Se seleccionaron quince aislados de *M. fijiensis* de diferentes hospederos y procedentes de países ubicados en diferentes continentes (Tabla 1). Algunos ya han sido caracterizados en su nivel de agresividad y mediante marcadores moleculares (Fullerton y Olsen 1995; El Hadramy 2000; Carlier *et al.* 1994; 1996). Todos los aislados pertenecen a la colección internacional del CIRAD, (por su siglas en Francés: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), Francia, en donde están almacenados en glicerol a -80 °C.

Con el fin de maximizar la variación genética entre los padres y exista una mayor recombinación genética dentro de cada población F_1 , las combinaciones se realizaron entre aislados de distintos continentes, dando lugar a 38 parejas (Tabla 2). Cada uno de los aislados de *M. fijiensis* fue crecido en medio de cultivo V8 300 durante 8-10 días. Posteriormente y bajo condiciones asépticas para cada aislado se colectó independientemente el micelio, con la ayuda de un bisturí. Cada micelio fue colocado independientemente en un frasco que contenían en su interior pequeñas aspas y fue licuado en presencia de agua destilada estéril. Luego se usaron 5.0 ml del micelio licuado de cada uno de los aislados que se usarían como padres y estos se mezclaron en tubo Falcón estéril, dando un volumen aproximado de 10 ml de micelio licuado por cada pareja formada. Posteriormente, se plaquearon aproximadamente 500 μ l del micelio licuado de cada pareja en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo V8 para esporulación (100 ml de V8, 0.2 g de CaCO_3 , 900 ml de agua, pH 6.0 y 20 g de agar). En total se usaron 10 cajas de Petri por cada una de las 38 parejas formadas.

Cuadro 2.1. Aislados monoascospóricos de *Mycosphaerella fijiensis* seleccionados de diferentes países y hospederos.

Código ^a	Mating type ^b	Cultivar (Genoma)	Año de Colecta	Nivel de Agresividad ^c	País	Colector
G1	IN	Cavendish (AAA)	1999	Bajo	Filipinas	X. Mourichon, CIRAD
86	+	IN	1988	Alto	Camerún	X. Mourichon, CIRAD
89	-	IN	1988	Alto	Camerún	X. Mourichon, CIRAD
138	+	Figue Suc	1990	Medio	Colombia	T. Lescot, CIRAD
139A	-	French Plantain	1990	IN	Colombia	T. Lescot, CIRAD
282	IN	T8 (AA)	1990	IN	Tonga	R. Fullerton, HFRINZ
1229	IN	Enano Gigante (AAA)	2003	IN	México	A. James, CICY
1230	IN	Enano Gigante (AAA)	2003	IN	México	A. James, CICY
1231	IN	Enano Gigante (AAA)	2003	IN	México	A. James, CICY
1232	IN	Enano Gigante (AAA)	2003	IN	México	A. James, CICY
1233	IN	Enano Gigante (AAA)	2003	IN	México	A. James, CICY
1235	IN	Enano Gigante (AAA)	2003	IN	México	A. James, CICY
1239	IN	Yangambi (AAA)	2003	IN	Camerún	A. Mouliom-Perfoura, CARBAP
1240	IN	Yangambi (AAA)	2003	IN	Camerún	A. Mouliom-Perfoura, CARBAP
1241	IN	Yangambi (AAA)	2003	IN	Camerún	A. Mouliom-Perfoura, CARBAP

^a Código del CIRAD, Francia.

^b Mating type (grupo de apareamiento) (+) más, (-) menos según Mourichon y Zapater (1990).

^c Nivel de agresividad determinado por El Hadramy, 1999 y Fullerton y Olsen, 1995.

IN: Información no reportada.

CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement), HFRINZ (The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand), CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán) y CARBAP (Centre Africain de Recherche sur Bananes et Plantains).

Cuadro 2.2. Características de cada una de las 38 parejas formadas de *Mycosphaerella fijiensis* en el presente trabajo

Numero de código Mating type País de origen Hospedero Nivel de agresividad	CIRAD86 mating type+ Camerún IN Alto	CIRAD89 mating type- Camerún IN Alto	CIRAD138 mating type+ Colombia Figue Suc Medio	CIRAD139A mating type- Colombia French plantain IN	CIRAD1229 IN México Enano Gigante IN	CIRAD1231 IN México Enano Gigante IN	CIRAD1233 IN México Enano Gigante IN	CIRAD1235 IN México Enano Gigante IN
CIRAD86 mating type+ Camerún IN Alto				X	X	X	X	X
CIRAD89 mating type- Camerún IN Alto			X		X	X	X	X
CIRADG1 * Filipinas IN Bajo	X	X	X	X	X	X	X	X
CIRAD282 * Tonga T8 IN	X	X	X	X	X	X	X	X
CIRAD1239 * Camerún Yangambi km 5 IN					X	X	X	X
CIRAD1240 * Camerún Yangambi km 5 IN					X	X	X	X
CIRAD1241 * Camerún Yangambi km 5 IN					X	X	X	X

IN : Información no reportada.

* : Mating type no conocido antes del experimento.

X : Pareja

Por último, se colocó celofán de forma circular y del mismo tamaño de la caja de Petri estéril, cubriendo el medio plaqueado con el licuado de cada una de las parejas seleccionadas. Las cajas de Petri fueron selladas con parafilm y se incubaron en una cámara de crecimiento a 20°C con luz continua durante un periodo de 30 días. Las cajas de Petri que fueron previamente incubadas de cada una de las parejas, fueron analizadas mediante la obtención de un corte de celofán y su posterior tinción con azul de algodón, esto con la finalidad de analizar la formación de peritecios. Los cortes fueron observados bajo un microscopio estereoscópico.

Las parejas que fueron compatibles sexualmente y que mostraron una gran cantidad de peritecios fueron seleccionadas para obtener las poblaciones F₁ de *M. fijiensis*. Los peritecios fueron colectados con una aguja de disección en medio de agar-agua; enseguida se utilizó la punta globosa de una pipeta Pasteur con la finalidad de expulsar las ascosporas que se encontraban en el interior de las ascas. Posteriormente, las ascosporas fueron colectadas y cultivadas en medio PDA para desarrollar cultivos monoascosporicos de cada población F₁. Finalmente las poblaciones F₁ que se obtuvieron se almacenaron en forma de fragmentos de micelio en glicerol al 15% a -80 °C en el Laboratorio de Biología y Genética de las Interacciones Planta-Patógenos del CIRAD.

2.2 Extracción del ADN

Para la extracción del ADN genómico de toda la progenie (126 cultivos monoascosporicos) y los padres (CIRAD86 y CIRAD139A) se siguió la metodología descrita por Raeder y Brodar (1995) con algunas modificaciones. El micelio fue cultivado en medio V8 300 durante 15 días, luego fue colectado con un bisturí y secado en un horno a 55°C durante 12 horas. El micelio seco fue molido dentro de un mortero en presencia de arena de textura fina estéril con la ayuda de un pistilo. El polvo fino obtenido fue colocado en tubos Eppendorf estériles de 2.0 ml.

A los tubos conteniendo los micelios macerados se les agregaron 800 µl de buffer extracción (1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl, 1% β-mercaptoetanol y 1% CTAB) y se incubaron durante 45 min a 65 °C. Después se le adicionaron 1 vol de la solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron suavemente.

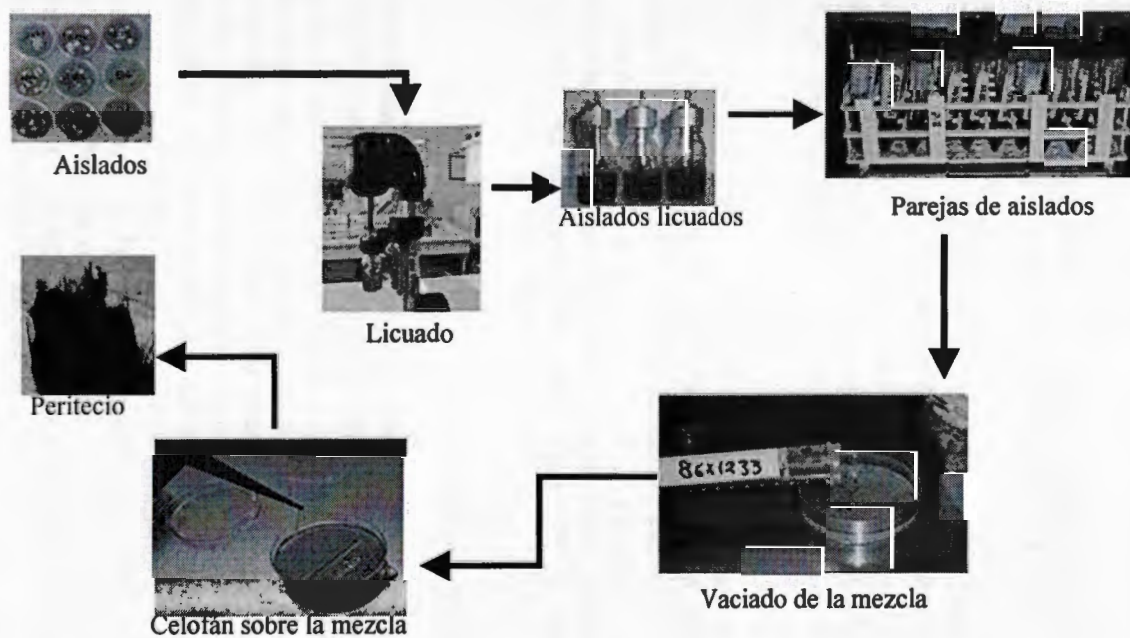


Figura 2.1. Procedimiento para realizar cruzas bajo condiciones *in vitro* del hongo *Mycosphaerella fijiensis* y obtener poblaciones F₁.

Enseguida se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. La fase acuosa fue transferida a tubos Eppendorf de 2.0 ml, se le adicionó 800 µl de la solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente.

La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo agregándosele 600 µl de isopropanol frío, se incubó a 4 °C durante 10 min para precipitar el ADN y se centrifugó durante 10 min. El sobrenadante obtenido se decantó, quedando la pastilla del ADN en el fondo del tubo. Las pastillas se lavaron con 2.0 ml de etanol al 70%; posteriormente la pastilla se secó al vacío durante 15 min. A cada muestra de ADN extraído se le adicionaron 200 µl de una solución de RNasa (100 µg/ml) y una solución de TE (Tris-EDTA) y por ultimo se incubaron durante 10 min a 65° C.

Posteriormente, se cuantificó el ADN de cada muestra en geles de agarosa al 0.8%, conteniendo TBE 1X y 5 µg/ml de bromuro de etidio y empleando un ADN estándar de concentración conocida; la concentración también fue calculada por medio de un espectrofotómetro. Las concentraciones de cada muestra de ADN fueron ajustadas a 100 ng/µl. Todas las muestras se mantuvieron a 4° C.

2.3 Identificación del locus MAT

La PCR se llevó de acuerdo al protocolo de Conde-Ferraz *et al.*, (2007), cada reacción contenía 10 ng de ADN genómico de los aislados CIRAD86 y CIRAD139A, o de los individuos obtenidos en la población F₁. Las mezclas de reacción fueron preparadas como sigue: buffer 1x, 1.5 mM de cloruro de magnesio, 800 µM dNTPs, 0.4 µM de cada uno de los oligonucleótidos forward y reverse (SIGMA) y 0.35 U de *Taq* ADN polimerasa (ROCHE). Todas las reacciones fueron realizadas en un termociclador Perkin-Elmer 9700. Las condiciones fueron: una desnaturalización de 94° C por 4 min, 94° C 1 min, temperatura de empalme de 62° C por 40 s, una extensión de 72° C por 40 s, por 35 ciclos y por último una extensión final de 72° C, 7 min. Posteriormente, el ADN templado fue corrido en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio para la visualización de las bandas.

2.4 Análisis de AFLP

Los análisis de los marcadores AFLP fueron realizados en el laboratorio de marcadores moleculares de la unidad de ingeniería genética del CINVESTAV unidad Irapuato.

Los análisis de AFLP se realizaron de acuerdo a Vos *et al.* (1995) utilizando el kit IRDye™ Fluorescent AFLP® (LI-COR, Lincoln, NE). El protocolo consiste de cinco pasos principales: *i*) preparación del templado primario mediante digestión con dos enzimas de restricción (*MseI* y *EcoRI*); *ii*) ligación con adaptadores específicos que son ligados a los extremos de los fragmentos restringidos; *iii*) una preamplificación con dos oligonucleótidos complementarios a los extremos de los adaptadores ligados; *iv*) amplificación selectiva con oligonucleótidos selectivos con dos nucleótidos (+2) adicionales en el extremo 3' y *v*) separación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos amplificados selectivamente.

2.4.1 Digestión del ADN genómico

El ADN genómico de cada uno de los parentales (CIRAD86 y CIRAD139A) y de la progenie (61 cultivos monoascosporicos) de *M. fijiensis* fueron digerido con *EcoRI* y *MseI*, éstas contenidas en una mezcla (1.25 U/ μ l de cada enzima en 10 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 μ g/ml BSA, 50% (v/v) de glicerol y 15% de triton X-100). De cada una de las muestras se tomaron 100 ng de ADN genómico y se mezcló en un volumen final de 12.5 μ l, conteniendo 2.5 μ l de buffer de reacción 5X (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM Mg-acetato, 250 mM K-acetato) y agua deionizada estéril a un volumen final de 12.5 μ l.

Las muestras se mezclaron suavemente, se centrifugaron brevemente y por último se incubarán a 37°C por 2 h. La reacción se detuvo incubándola a 70°C por 15 min para inactivar las enzimas y posteriormente se colocaron en hielo. Después de la digestión, el ADN fue examinado por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, para analizar si hubo una digestión completa de las muestras.

2.4.2 Ligación de los adaptadores *EcoRI* y *MseI*

La ligación con los adaptadores se realizó adicionando a las muestras digeridas previamente, 10 µl de la mezcla de ligación conteniendo 2.5 U de T4 ADN ligasa y 12.0 µl de adaptadores *EcoRI/MseI* (0.4 mM ATP, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Mg-acetato y 50 mM K-acetato). Las reacciones se mezclaron brevemente y se centrifugaron y por último se incubaron a 20° C por 2 h y posteriormente se almacenarán a -20° C. Cada una de las reacciones se diluyó 1:10 volúmenes, se transfirió 10 µl de la mezcla a un microtubo nuevo de 0.5 ml, se adicionaron 90 µl de buffer TE y se mezcló suavemente.

2.4.3 Preamplificación de los marcadores AFLP

La preamplificación se realizó mediante una reacción de PCR en un volumen total de 25.5 µl, teniendo 2.5 µl de la mezcla de ligación (1:10) previamente diluida, 20.0 µl de mezcla de oligonucleótidos AFLP, 2.5 µl de buffer 10X PCR de reacción y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (ROCHE). Las muestras se mezclaron y se centrifugaron brevemente. Las condiciones de la PCR fueron 20 ciclos con un paso de desnaturalización por 30 s a 94° C, un paso de empalme por 1 min a 56° C y un paso de extensión de 1 min a 72° C. Los productos de preamplificación de la PCR fueron diluidos 1:40 volúmenes con agua destilada estéril.

2.4.4 Amplificación selectiva de los marcadores AFLP

Para la amplificación selectiva, se emplearon oligonucleótidos complementarios a los adaptadores adicionales en el extremo 3'. La mezcla tenía un volumen final de 11.0 µl, conteniendo 6.0 µl mezcla *Taq* DNA polimerasa (158.0 µl de agua deionizada, 40.0 µl de buffer 10X de amplificación y 2.0 µl *Taq* DNA polimerasa: 5 U/µl), 2.0 µl de la dilución del DNA preamplificado, 2.0 µl del oligonucleótido *MseI* conteniendo dNTPs, 0.5 µl del oligonucleótido *EcoRI* marcado IRDye™ 700 (LI-COR, Lincoln, NE) y 0.5 µl del oligonucleótido *EcoRI* marcado IRDye™ 800 (Cuadro 3). Al final se analizó un total de 44 combinaciones de oligonucleótidos AFLP (Cuadro 4).

La PCR se llevó a cabo en 13 ciclos, con un paso de desnaturalización por 30 s a 94° C, un paso de empalme por 30 s a 65° C con un

decremento en la temperatura de 0.7° C por ciclo, y un paso de extensión de 1 min a 72° C, seguido por 20 ciclos con un paso de desnaturalización por 30 s a 56° C y un paso de extensión de 1 min a 72° C. Tanto la preamplificación como la amplificación selectiva se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9600

Cuadro 2.3. Secuencia de oligonucleótidos AFLP usadas para la amplificación selectiva.

Oligonucleótido	Secuencia 5' = 3'
<i>EcoRI</i>	
E+AA (700 nm)	AGA CTG CGT ACC AAT TCA A
E+AC (800 nm)	AGA CTG CGT ACC AAT TCA C
E+AG (800 nm)	AGA CTG CGT ACC AAT TCA G
E+AT (700 nm)	AGA CTG CGT ACC AAT TCA T
<i>MseI</i>	
M+AA	GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAA
M+AC	GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAC
M+AG	GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAG
M+AT	GAC GAT GAG TCC TGA GTA AAT

Cuadro 2.4. Total de combinaciones de oligonucleótidos AFLP usadas para el análisis de la progenie de *Mycosphaerella fijiensis* (CIRAD86 X CIRAD139A).

	E+AA	E+AC	E+AG	E+AT
M+AA	√	√	√	√
M+AC	√	√	√	√
M+AG	√	√	√	√
M+AT	√	√	√	√
M+GA	√	√	√	√
M+GC	√	√	√	√
M+GG	√	√	√	√
M+GT	√	√	√	√
M+TA	√	√	√	√
M+TC	√	√	√	√
M+TG	√	√	√	√
M+TT	√	√	√	√

2.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para el análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, 3 µl de los productos de la amplificación selectiva fueron disueltos en 2 µl de la solución desnaturante (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8.0, con azul de bromofenol 0.1% y xilencianol 0.1%). Las muestras se desnaturaron incubándolas durante 3 min a 90° C y rápidamente se enfriaron en hielo. Se cargaron 0.8 µl de cada muestra en un gel desnaturante al 4% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 20:1; urea 8 M y el buffer del gel fue de TBE 1X pH 8.0) de 0.4 mm.

El gel fué previamente precorrido sin muestras durante 30 min a 70 W, 36 mA y 2000 V, en una cámara de electroforesis del analizador LICOR IRD² (Lincoln, NE). Las condiciones de electroforesis fueron de 60 W, 36 mA y 2000 V durante 2 h; se uso TBE 1X como buffer de electroforesis.

2.6 Análisis de marcadores microsatélites

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en volúmenes de 25 µl, conteniendo 2 mM de MgCl₂, 0-2 mM de dNTPs, 12.5 pmol de cada oligonucleótidos de microsatélites, 0.625 U de *Taq* ADN polimerasa, 16 mM (NH₄)SO₄, 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.01% de Tween 20 y 2 ng de templado de AND. Después de la desnaturalización inicial (94°C, 2 min), la PCR incluyó 30 ciclos (94°C for 30 s, 55°C por 45 s, 72°C for 45 s) y una extensión final (72°C; 7 min).. Por ultimo las muestras fueron separadas en gel de agarosa al 2.0 % y teñido con bromuro de etidio para su posterior visualización y análisis.

2.7 Análisis de los datos y construcción del mapa

Las imágenes de los geles (marcadores AFLP y SSR) fueron analizadas usando el sistema binario de presencia y ausencia de las bandas, asignándoles valores de 1 y 0, respectivamente. Los marcadores AFLP fueron denominados por la combinación usada de oligonucleótidos y el tamaño aproximado de la banda generada. La longitud de cada marcador AFLP fue estimada en base al marcador de peso molecular fluorescente de 700 pb (LI-COR, Lincoln, NE) y el análisis de los datos fue mediante el uso del software SAGA^{MX} (LI-COR, Lincoln, NE). Las bandas monomórficas entre ambos padres no fueron leídas. Para los marcadores AFLP, el prefijo A o B indica el origen del marcador, ya sea CIRAD86 o CIRAD139A, respectivamente, seguida por la combinación de oligonucleótidos empleada y el tamaño molecular (pb). Por ejemplo, BEAAMAG372 representa un marcador AFLP originado de CIRAD139A y amplificado por la combinación de oligonucleótidos E+AA y M+AG con un tamaño molecular de 372 pb. Los marcadores SSR fueron identificados primeramente por SSR y seguido por el nombre previamente designado. Los radios de la segregación de todos los marcadores fueron analizados con el software JoinMap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001). En general la contracción del mapa fue realizada como se describe por Luna- Martínez *et al.* (2007).

Para generar inicialmente los grupos de ligamiento, solamente se seleccionaron los marcadores con radios de segregación balanceada (1:1). Se usó un valor mínimo de LOD de 3.0 y una fracción máxima de recombinación de 0.25 para establecer las relaciones de ligamiento entre marcadores. La función Kosambi para el mapeo fue usada para

convertir la frecuencia de recombinación a la distancia del mapa en valores de centimorgans (cM).

El tipo de población fue codificada como HAP, ejem. una población haploide derivada de un padre diploide heterocigoto. Los marcadores con radio de segregación significativamente diferentes del radio esperado de 1:1 ($\chi^2 \leq 7.7$; $P \geq 0.01$) fueron eliminados ya que un análisis de mapeo inicial mostró que ellos podrían causar errores de agrupamiento de marcadores no ligados. El análisis de ligamiento fue llevado a cabo sobre los marcadores remarcados con un valor de $P \geq 0.01$. La asignación inicial a los grupos de ligamiento (GL) fue basada en el logaritmo de radio de probabilidad (LOD) de cada posible par de marcadores. En este estudio fueron usados valores de LOD de 3.0 a 9.0, pero el ensamblaje final de los GL fue determinado por el uso de un valor mínimo de LOD de 3.0 con un máximo de fracción de recombinación de 0.4 ($LOD \geq 0.8$). La función de mapeo de Kosambi fue usada para computar la distancia de la recombinación en centimorgans (cM). Se evaluó si los marcadores con un radio de distorsión de la segregación podrían contribuir para el mapa.

2.8 Estimación de la longitud del genoma y cobertura

La longitud del genoma y su cobertura fue determinados basándose principalmente en Luna- Martínez *et al.* 2007.

La longitud del genoma \hat{G} fue estimada usando el método de Hulbert *et al.* (1988), modificado en el método 3 de Chakravarti *et al.* (1991), en el cual $\hat{G} = n(n-1)d/k$, donde n es el número total de marcadores, d es la distancia del mapa correspondiendo al valor de LOD T para declarar ligamiento, y k es el número de marcadores ligados a LOD T o superiores.

También se utilizó un estimado modificado G (Remington *et al.* 1999) que corrige la estimación del método de Hulbert

$$G = \left(\frac{n(n-1)d}{2k} \right) \left(1 + \sqrt{1 - \frac{2Ck}{n(n-1)}} \right)$$

Se estimó la porción c del genoma dentro de l cM de un marcador, asumiendo una distribución al azar del marcador, usando la relación

$$c = 1 - e^{-2n/G}$$

donde G es la longitud estimada del genoma y n es el número de marcadores (Lange and Boehnke 1982).

REFERENCIAS

- Carlier J., Lebrun M.H., Zapater M. Dubois C. and Mourichon X.** 1996. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 5:499-510.
- Carlier J., Mourichon, X., Gonzalez-de León, D., Zapater, M. and Lebrun, M.H.** 1994. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. *Phytopathology* 84:751-756.
- Conde-Ferrández L, Waalwijk C, Canto-Canché B, Kema GHJ, Crous P, James A, Abeln E** (2007) Isolation and characterization of the *mating type* locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana. *Mol Plant Pathol* 8:111-120.
- El Hadramy, 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*. Thèses, Gembloux.
- Fullerton, R.A., and Olsen, T.L.** 1995. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science.* 23:39-48.
- Kosambi, D.D.** 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annual Eugenetics* 12:172-175.
- LI-COR Bioscience** 2004. www.licor.com

- Mourichon, X., et Zapater, M.F.** 1990. Obtention *in vitro* du stade *Mycosphaerella fijiensis* forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. Fruits 45:553-557.
- Myburg A.A., Remington D.L., O'Malley D.M., Sederoff R.R. and Whetten R.W.** 2001. High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automated DNA sequencer. BioTechniques 30: 348-357.
- Stam P.** 1993 Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package. JOINMAP. Plant J. 3: 739–744.
- Van Ooijen J.W. & R.E. Voorrips** 2001. JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van der Lee T. A. J., Hornes M., Freijter A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M.** 1995 AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407–4414.

CAPITULO 3

Construction of a genetic linkage map of the fungal pathogen of banana *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak disease

Abstract

A genetic linkage map of the fungal plant pathogen *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak disease of banana was developed. A cross between the isolates CIRAD86 (from Cameroon) and CIRAD139A (from Colombia) was analyzed using molecular markers and the *MAT* locus. The genetic linkage map consists of 298 AFLP and 16 SSR markers with twenty three linkage groups, containing 5 or more markers, covering 1879 cM. Markers are separated on average by around 5.9 cM. The *MAT* locus was shown to segregate in a 1:1 ratio but could not be successfully mapped. The relation between physical size and genetic distance was approximately 40.9 kb/cM. The estimated total haploid genome size was calculated using the genetic mapping data at 4303.5 cM. This is the first genetic linkage map reported for this important foliar pathogen of banana. The great utility of the map will be for evolutionary studies in comparison with other fungi, to identify quantitative trait loci associated with aggressiveness or oxidative stress resistance and to provide a framework for *M. fijiensis* genome sequencing.

Keywords Ascomycete; Genetic mapping - Black Sigatoka - AFLP markers - SSR markers - Crosses.

Manuscrito en preparación para someterlo a la revista Current Genetics

3.1 Introduction

The haploid, hemibiotrophic ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet [anamorph *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton] causes black leaf streak disease (BLS) (commonly known as black Sigatoka), the most economically important disease of banana (*Musa* spp.) in tropical and subtropical areas (Marín et al. 2003). BLS causes leaf necrosis and plant defoliation, resulting in yield losses and poor-quality fruit which is prone to premature ripening. Fungicide control of the disease can contribute up to 40 % of the direct costs of production; and these costs are beyond the means of many smallholders (Marín et al. 2003). *M. fijiensis* is a heterothallic, filamentous fungus which can be easily cultured on both liquid and solid media; in addition, sexual crosses can be made under laboratory conditions (Mourichon and Zapater, 1990). Both anamorphs and teleomorphs are present on infected leaves. Ascospores, produced during the sexual stage, play an important epidemiological role through wind-borne dispersal.

The analysis of *M. fijiensis* population structure has been undertaken using different types of molecular markers (Carlier et al. 1996; Neu et al. 1999; Rivas et al. 2004). Genetic diversity in populations from other geographical regions outside south East Asia (South America, Africa and the Pacific Islands) have been considered to indicate founder events, since alleles in common with populations from Papua New Guinea and the Philippines, were identified but lower levels of genetic diversity in general were also observed (Carlier et al. 1996). Analysis of gene flow and dispersal processes of *M. fijiensis* at the continental scale, from population structure analysis in recently invaded regions, was carried out by Rivas et al. (2004), who showed that founder effects accompanied the recent invasion of *M. fijiensis* in the African and Latin America-Caribbean regions, suggesting stochastic spread of the disease at the continental level (Rivas et al. 2004).

Recombination caused by sexual reproduction is one of the most important evolutionary forces shaping the genetic structure of a pathogen population. The teleomorph of *M. fijiensis* contributes greatly to the amount of genetic variation detected in fungal populations where the two mating types exist. Recently the *mating type* locus of *M. fijiensis* was isolated and characterized (Conde-Ferrández et al. 2007), this information will be beneficial in population genetic analysis, evolutionary studies, or in studies of traits affecting population structure. The mapping of *MAT* locus within the *M. fijiensis* genome is therefore important.

In order to study the location and inheritance of important genes of interest such as those for avirulence, toxins, intersterility, vegetative compatibility, host specificity and the mating type, genetic linkage maps of fungal genomes have been constructed using restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) amplified fragment length polymorphisms (AFLP) and simple sequence repeat (SSR) markers. The majority of fungal and Oomycetes genetic linkage maps have been constructed in Ascomycetes (Cozijnsen et al. 2000; Jurgenson et al. 2002; Zhong et al. 2002; Pedersen et al. 2002; Luo et al. 2005; Kubisiak and Milgroom, 2006; Luna-Martínez et al. 2007), Basidiomycetes (Muraguchi et al. 2003; Lind et al. 2005; Forche et al. 2000; Marra et al. 2004) and in Oomycetes (May et al. 2002; Van der Lee et al. 1997; Sicard et al. 2003).

Knowledge of the genome organization of *M. fijiensis* should provide an insight into the high phenotypic variability observed among isolates, specifically, the variability in pathogenicity and aggressiveness (Fullerton and Olsen, 1995). Electrophoretic karyotyping of 10 Mexican isolates resolved between 8 to 13 chromosomes giving a genome size ranging from 27 to 35 Mb (Rodríguez-García et al. 2006). At present the only genetic linkage map available within the Mycosphaerellaceae is from *Mycosphaerella graminicola* (Kema et al. 2002). Both *M. fijiensis* and *M. graminicola* have been selected for whole-genome sequencing within the DOE-JGI Community Sequencing Program (see www.jgi.doe.gov/sequencing/cspseqplans2006.html). The *M. fijiensis* isolate CIRAD86 was used for genome sequencing and is one of the parents of the mapping population reported in the present work. The genetic map of *M. fijiensis* will be useful for anchoring contigs for sequence assembly, for map-based cloning and for the identification of genomic regions of interest for comparative genomic studies with other species. The objectives of this study were to 1) perform crosses under *in vitro* conditions between isolates of *M. fijiensis* from different continents and from different cultivars, for the development of F₁ populations, 2) to develop a map set of SSR markers, 3) to analyze an F₁ population with AFLP, SSR markers and the *MAT* locus in order to generate a genetic linkage map of *M. fijiensis* and 4) estimate the genome size of this organism based on the mapping data.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Fungal isolates and growth conditions for crosses

Twelve isolates of *M. fijiensis* from different countries and cultivars of bananas were used as parentals (Table 1). Crosses were made following the method previously described by Mourichon and Zapater (1990). Two or four ascospores were selected per ascus to carry out test crosses between potential parental lines. Isolates from different continents and with differing levels of aggressiveness, were used in order to maximize the genetic variation between parental isolates (Table 1). The F₁ progeny population chosen for mapping, was derived from isolates CIRAD86 (from Cameroon, isolated in 1988; *mating type* +; this same isolate has been used for genome sequencing) and CIRAD139A (from Colombia, isolated in 1990, *mating type* -). The F₁ progeny population consists of 126 individuals derived from a single cross. One hundred and ten isolates were analyzed using 19 SSR markers; of these, 44 isolates were shown to have the same genotype as the CIRAD139A parent and 3 had the same genotype of the CIRAD86 parent; these isolates are probably clones produced by mitosis or possibly from asexual spores and were removed from the mapping population. A final population of 61 F₁ isolates was selected for genetic map development. The mating type of 61 F₁ isolates was determined by PCR (polymerase chain reaction) with mating type-specific primers MAT1-1 and MAT1-2 (Conde-Ferráez et al. 2007).

3.2.2 DNA extraction

The parental isolates (CIRAD139A and CIRAD 86) and F₁ progeny population were grown in PDA medium for 8-12 days at 25°C; the mycelia was harvested and dried for 1 day in an oven at 50°C. Total genomic DNA was extracted following acetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-based procedure (Carrier et al. 1996).

3.2.3 AFLP analysis

Restriction, ligation, and preamplification reactions were performed essentially as described in the original AFLP protocol of Vos et al. (1995). A total of 48 primer combinations (Table 2) were analyzed out using the IRDye™ fluorescent AFLP® Kit from LI-COR for small plant genome analysis according to the instructions provided by the manufacturer. All M+2 selective primers were synthesized by SIGMA GENOSYS (The

Woodlands, TX) and IRDye™ -700 and IRDye™-800 labeled E+2 primers were purchased from LI-COR (Lincoln, NE). AFLP fragments were resolved on gels prepared with 6% KB Plus Polyacrylamide Gel Matrix (LI-COR, Lincoln, NE). Electrophoresis and detection of the AFLP fragments were performed on a 4200 LI-COR IR2 automated DNA sequencer and gel AFLP images were scored using SAGA^{MX} software (LI-COR, Lincoln, NE) and saved as TIF files for further analysis.

3.2.4 Linkage analysis and genetic map construction

The gel images (for AFLP and SSR markers) were scored using a binary scoring system that recorded the presence and absence of bands as 1 and 0, respectively. AFLP markers were denominated by the primer combination used for the amplification and the approximated length of the generated fragment. The length of each AFLP marker was estimated on the basis of a fluorescently labeled 700-bp ladder (LI-COR, Lincoln, NE) and data analysis was performed using SAGA^{MX} (LI-COR, Lincoln, NE) software. Monomorphic markers common to both parents were not scored. For the AFLP markers, the prefix A or B indicates the origin of each marker; the former corresponds to parent CIRAD86, whilst the latter prefix corresponds to parent CIRAD139A; this prefix is followed by the primer combination used and the molecular size (in base pairs). For example, BEAAMAG372 represents an AFLP marker originating from the isolate parent CIRAD139A and amplified by primer pairs E+AA and M+AG, and showing a molecular size of 372 bp. The SSR markers are identified by SSR followed by the name determinate. Segregation ratios of all markers were analyzed with JoinMap 3.0 software (Van Ooijen and Voorrips, 2001). Map construction was carried out essentially as described in Luna-Martínez et al. 2007.

Table 3.1. *In vitro* random crosses between 12 single ascospore isolates of *Mycosphaerella fijiensis*.

Code number Mating type Country of origin Host Level of aggressiveness	CIRAD86 mating type+ Cameroon DN High	CIRAD89 mating type- Cameroon DN High	CIRAD138 mating type+ Colombia Figue Suc Medium	CIRAD139A mating type- Colombia French plantain DN	CIRAD1229 * Mexico Gigan Naine DN	CIRAD1231 * Mexico Gigan Naine DN	CIRAD1233 * Mexico Gigan Naine DN	CIRAD1235 * Mexico Gigan naine DN
CIRAD86 mating type+ Cameroon DN High				X	X	X	X	X
CIRAD89 mating type- Cameroon DN High			X		X	X	X	X
CIRADG1 * Philippines DN Low	X	X	X	X	X	X	X	X
CIRAD282 * Tonga Tb DN	X	X	X	X	X	X	X	X
CIRAD1239 * Cameroon Yangambi km 5 DN					X	X	X	X
CIRAD1240 * Cameroon Yangambi km 5 DN					X	X	X	X
CIRAD1241 * Cameroon Yangambi km 5 DN					X	X	X	X

DN: Date not reported.

* Mating type not known before the experiment.

X pair

The population type was coded as HAP, i.e., a haploid population derived from a heterozygous diploid parent. Markers with segregation ratios significantly different from the expected 1:1 ratio ($\chi^2 \leq 7.7$; $P < 0.01$) were set aside because initial mapping analysis showed that they may cause erroneous grouping of unlinked markers. Linkage analysis was performed on the remaining markers with $P \geq 0.01$. Initial assignment to linkage groups (LG) was based on the logarithm of the odds (LOD) ratio for each possible marker pair. In this study we used LOD values of 3.0 to 9.0, but the final assembly of LG was determined by using a minimum LOD value of 3.0 with a maximum recombination fraction of 0.4 (LOD ≥ 0.8) and a threshold of 5.0 for the removal of loci with respect to jumps in goodness-of-fit during the calculation of a linear order of loci within a linkage group. The Kosambi mapping function was used to compute recombination distance in centimorgans (cM).

3.2.5 Estimation of genome length and coverage

Genome length and coverage was determined essentially as described in Luna- Martínez et al. 2007.

3.3 Results

3.3.1 Mating between isolates

Among 38 pairs evaluated for crosses under *in vitro* conditions, only 9 couples (Table 1) produced mature pseudothecia within 25 to 35 days following the confrontation of the potential parental strains. Each of the pairs produced different numbers of pseudothecia, indicating variable levels of fertility between them. Of the 9 fertile pairs, the following 3 produced the greatest number of pseudothecia: CIRAD86 (from Cameroon) x CIRAD139A (from Colombia); CIRAD138 (from Colombia) x CIRADG1 (from Philippines); and CIRAD1233 (from Mexico) x CIRADG1 (from Philippines). Isolates CIRAD282, CIRAD 1241, CIRAD1239, CIRAD1231 and CIRAD1235 were completely sterile (produced no pseudothecia) when crossed with either mating type+ or mating type- (Table 1). The three combinations producing many pseudothecia were selected as the best candidates for the development of the three segregating F₁ progeny populations of *M. fijiensis*. For the F₁ population, from the cross between the isolates CIRAD139A x CIRAD86, 126 progeny were obtained; from the cross CIRADG1 x CIRAD138, 101 progeny were obtained, whilst 123 progeny were obtained from the cross CIRADG1 x CIRAD1233. The cross

CIRAD139A x CIRAD86 with the greatest number of segregants was selected for the construction of the genetic linkage map of *M. fijiensis*.

3.3.2 AFLP and SSR analysis of the mapping population

Forty eight AFLP primer combinations produced in total 663 AFLP bands which were polymorphic between the parents; 346 were present in the parent CIRAD86, and 317 fragments were present in the parent CIRAD139A (Table 2). The number of polymorphisms distinguishing between the parents ranged from 5 (for primer pairs E+AC-M+AT) to 27 (for primer pairs E+AT-M+TC) with an average of 13.8 polymorphic markers per primer pair (Table 2). There was no evidence of a relationship between the composition of the selective nucleotides and the number of polymorphic fragments obtained. Of the 32 SSR markers that were analyzed, all were polymorphic between the parental isolates CIRAD86 and CIRAD139A, and were used for genotyping the progeny and linkage analysis.

3.3.3 Linkage analysis and map construction

A total of 696 loci were analyzed (663 AFLP markers, 32 SSR markers and the *MAT* locus) using the JoinMap 3.0 software (Van Ooijen and Voorrips, 2001). Forty eight AFLP markers (6.8%) showed significant distortion in segregation from the expected 1:1 ratio ($\chi^2 > 7.7$; $P < 0.01$) and they were excluded from the linkage analysis. Of these markers, 32 were identified in CIRAD86 and 16 in CIRAD139A; therefore 649 (93%) markers had a $P \geq 0.01$ (616 AFLP, 32 SSR markers and the *MAT* locus) and were included in the linkage analysis. Of these 649 markers, 10 markers at $P = 0.01$, 48 markers were significantly different from a 1:1 ratio at $P = 0.05$, and 590 markers were not significantly different from a 1:1 segregation ratio. Nevertheless, 262 (40%) markers with $P > 0.01$, including the *MAT* locus did not show linkage and only 385 markers (19 SSR and 366 AFLP) showed linkage with another marker (56%). However, 20% (131) of the AFLP markers (Table 2) and 41% (13) SSR markers (Table 3) remained unlinked.

Two hundred and ninety eight AFLP markers and 16 SSR markers were assigned to 23 LGs containing 5 or more markers with minimum LOD values of 3.0. The map covered a total length of 1879 cM (Fig. 1) with an average distance between markers of 5.9 cM. The largest LG had 31 markers and was 192 cM in size (LG 1), and the smallest LG contained 7 markers and was 35 cM in size (LG 23). Analysis of the genetic linkage

map showed that 161 markers originated from the parental isolate CIRAD86 and 153 markers from CIRAD139A. The largest mapped distance between two markers was 21 cM (between AEACMTA177 and BEACMTT191) on LG 13. The general features of the map are summarized in Table 4.

Table 3.2. Segregation and mapping data for AFLP markers generated for the construction of the genetic linkage map of *Mycosphaerella fijiensis*.

AFLP primers combination	Polymorphic bands obtained			Distorted markers ^a	Unlinked markers ^b	Mapped markers			
	CIRAD86	CIRAD139	Total			CIRAD86	CIRAD139	Total	
1	E+AA-M+AA	7	8	15	0	10	2	3	5
2	E+AA-M+AC	8	7	15	2	9	3	1	4
3	E+AA-M+AG	16	7	23	3	12	6	2	8
4	E+AA-M+AT	4	2	6	1	3	2	0	2
5	E+AA-M+GA	5	3	8	1	3	2	2	4
6	E+AA-M+GC	13	6	19	0	7	8	4	12
7	E+AA-M+GG	10	6	16	1	4	7	4	11
8	E+AA-M+GT	8	6	14	3	5	4	2	6
9	E+AA-M+TA	6	6	12	3	2	4	3	7
10	E+AA-M+TC	8	9	17	1	4	5	7	12
11	E+AA-M+TG	1	15	16	2	6	1	7	8
12	E+AA-M+TT	12	6	18	1	3	9	5	14
13	E+AC-M+AA	3	6	9	0	7	0	2	2
14	E+AC-M+AC	4	6	10	0	4	2	4	6
15	E+AC-M+AG	4	2	6	0	5	1	0	1
16	E+AC-M+AT	2	3	5	0	5	0	0	0
17	E+AC-M+GA	6	3	9	0	3	4	2	6
18	E+AC-M+GC	2	11	13	1	4	0	8	8
19	E+AC-M+GG	12	6	18	1	5	8	4	12
20	E+AC-M+GT	6	9	15	1	8	2	4	6
21	E+AC-M+TA	12	6	18	1	4	9	4	13
22	E+AC-M+TC	10	7	17	0	7	7	3	10
23	E+AC-M+TG	7	7	14	0	3	6	5	11
24	E+AC-M+TT	9	6	15	1	6	5	3	8
25	E+AG-M+AA	5	8	13	2	7	1	3	4

26	E+AG-M+AC	7	5	12	0	5	4	3	7
27	E+AG-M+AG	4	6	10	0	3	3	4	7
28	E+AG-M+AT	2	4	6	0	4	1	1	2
29	E+AG-M+GA	6	4	10	2	3	3	2	5
30	E+AG-M+GC	10	7	17	2	11	3	1	4
31	E+AG-M+GG	8	7	15	2	7	2	4	6
32	E+AG-M+GT	7	4	11	1	2	5	3	8
33	E+AG-M+TA	7	9	16	1	8	3	4	7
34	E+AG-M+TC	10	8	18	1	6	4	7	11
35	E+AG-M+TG	5	6	11	1	6	1	3	4
36	E+AG-M+TT	7	9	16	0	4	5	7	12
37	E+AT-M+AA	5	9	14	1	5	3	5	8
38	E+AT-M+AC	4	10	14	1	1	4	8	12
39	E+AT-M+AG	3	4	7	0	1	3	3	6
40	E+AT-M+AT	8	5	13	0	3	5	5	10
41	E+AT-M+GA	11	4	15	1	9	3	2	5
42	E+AT-M+GC	9	9	18	0	9	3	6	9
43	E+AT-M+GG	12	9	21	0	3	9	9	18
44	E+AT-M+GT	4	3	7	0	3	3	1	4
45	E+AT-M+TA	15	6	21	3	6	9	3	12
46	E+AT-M+TC	12	15	27	4	11	4	8	12
47	E+AT-M+TG	5	7	12	2	1	4	5	9
48	E+AT-M+TT	5	6	11	1	2	3	5	8
Total		346	317	663	48	249	185	181	366
Percent		52.2	47.8	100			50.5	49.5	100
Average				13.8	1.0	5.2			7.6

^a Number of markers from the primer combination with a segregation distortion deviating from the assumed 1:1 ratio ($\chi^2 \geq 7.7$, $P \geq 0.01$).

^b Number of markers from the primer combination not linking to any other marker.

Table 3.3. Characteristics and segregation of the 32 SSR markers used for the construction of the genetic linkage map of *Mycosphaerella fijiensis*.

	Linkage group	Position in the linkage group	Locus	A:B ^a	Value of P ^b
1	1	44	MfSSR329	33:28	0.522
2	1	52	MfSSR314	29:32	0.700
3	1	63	MfSSR137	30:31	0.898
4	2	75	MfSSR359	33:28	0.522
5	2	82	MfSSR358	31:29	0.796
6	2	93	MfSSR334	32:27	0.515
7	2	111	MfSSR354	34:27	0.370
8	5	26	MfSSR325	30:28	0.792
9	5	49	MfSSR307	31:30	0.898
10	5	54	MfSSR326	30:29	0.896
11	6	18	MfSSR340	27:34	0.370
12	6	67	MfSSR244	22:37	0.050
13	8	36	MfSSR392	32:26	0.430
14	8	50	MfSSR025	31:27	0.599
15	9	23	MfSSR333	19:25	0.365
16	10	58	MfSSR394	26:35	0.249
17	33	0	MfSSR061	33:28	0.522
18	33	5	MfSSR319	32:29	0.700
19	33	19	MfSSR362	30:31	0.898
20	NG		MfSSR396	25:36	0.159
21	NG		MfSSR384	24:36	0.121
22	NG		MfSSR355	24:37	0.096
23	NG		MfSSR353	28:33	0.522
24	NG		MfSSR324	34:27	0.370
25	NG		MfSSR302	33:27	0.438
26	NG		MfSSR194	28:32	0.605
27	NG		MfSSR395	31:26	0.507
28	NG		MfSSR357	34:26	0.301
29	NG		MfSSR400	35:26	0.249
30	NG		MfSSR005	28:30	0.792
31	NG		MfSSR203	32:29	0.700
32	NG		MfSSR058	31:30	0.898

^a Ratio of parents CIRAD86 (A) to CIRAD139A (B) alleles.

^b Probability of χ^2 values. The null hypothesis of the χ^2 test is that the A:B segregation equals the 1:1 ratio ($\chi^2 \geq 7.7, P \geq 0.01$).

NG : not grouped

A further 68 AFLP markers and 3 SSR markers were assigned to smaller LGs linked to just one other marker. These markers formed another 26 smaller LGs; 6 groups of 4 markers, 7 groups of 3 markers and 13 LGs containing just two markers, the proportion of mapped markers in both parents CIRAD86 and CIRAD139A, were 34 and 37 markers, respectively.

The genome size of *M. fijiensis* in terms of map units calculated considering all LGs consisting of 2 markers or more was 2581 cM in total (Table 4). Using the *MAT*-specific PCR primers (Conde-Ferráez et al, 2007), 25 isolates amplified MAT1-1 and 36 isolates amplified MAT1-2. Both idiomorphs were present in nearly equal frequencies ($\chi^2 = 2.0$; $P = 0.4-0.5$). The most tightly linked marker to the *MAT* locus was BEACMTG503 at LOD 2.07; this value is below the LOD of 3.0 threshold used to construct the map. Other markers (9 AFLP and 1 SSR) were also linked to the *MAT* locus but with LOD values less than 3.0 (Table 5).

3.3.4 Segregation analysis reveals segregation distortion of mapped markers

The initial analysis showed 48 markers with a high segregation distortion from the expected 1:1 ratio (χ^2 values ≥ 7.7 ; $P < 0.01$); however markers showing lower levels of distortion ($P \geq 0.01$) were included in the analysis and some of them were successfully mapped. Of the 385 linked markers and that showed the expected 1:1 Mendelian segregation ratios in the progeny mapping population, 57 (6.2%) markers included in 18 of 23 LG showed segregation distortion: 27 markers with a significance level of 95% and 30 markers with 99% (Fig. 1). The numbers of markers with distortion by LG varied between 1 (on LG 15, LG 17, LG 21, and LG 23) to 10 markers (on LG 2). The 5 LG with no distorted markers were LG 10, LG 11, LG 16, LG 19 and LG 20.

3.3.5 Haplotype analysis

Distortion in the segregation ratios may be caused by skewing of markers, where the proportion of alleles from a single parental strain is much greater than expected. In order to visualize this skewing in the markers analyzed in this study, for each of the 61 F_1 progeny, the recombination frequency of each marker was calculated and plotted against the distal location (in cM) of the marker on the 23 linkage groups; a recombination frequency of 0.5 denoting independent segregation (Forche et al. 2000). An overall even distribution of parental alleles was observed, but some of the skewed

markers are located at the ends of LGs. For the 61 F₁ progeny, at all 649 loci, there were 18,536 alleles from CIRAD86, 19,438 alleles from CIRAD139A and only 1615 missing data points (4.1) (data not shown). Nonetheless, some of the LGs show a slight, though insignificant, bias toward one or the other parent. The LGs 3, 10, 21 and 22 are alightly toward parent CIRAD139A, while LG 2 is slightly skewed toward parent CIRAD86 as shown in Fig. 2.

3.3.6 Genome length and coverage

To estimate genome length, a combination of different methods based on mapping data and chromosome number was used (Hulbert et al. 1988; Remington et al. 1999; Chakravarti et al. 1991). A total of 4450 linked marker pairs were detected using a LOD threshold of 2.0, letting n represent 649 markers with a level of significance less than 0.01 used in linkage analysis.

The maximum distance associated with a value of LOD of 2.0 was 49.19 cM. The results using our data suggest a genome length (\hat{G}) of 4648.8 Kosambi cM employing Chakravati's method 3, whereas using the modified estimator reported by Remington et al, (1999), 4443 Kosambi cM and 4303.5 Kosambi cM were estimated, considering 8 and 13 chromosomes, respectively, based on the data of Rodriguez-Garcia et al (2006). Based on an estimation of 2581 cM for the genetic linkage map generated in this study (considering all the LGs), the map spans about 60% of the total length of the genome of *M. fijiensis* if this is considered in 4303.5 cM. The average map distance of one cM in kb of DNA is usually estimated by comparing the size of a physical map (in kb) to the length of its genetic map (in cM). Because the karyotype analysis estimated for *M. fijiensis* genome is approximately 35 Mb in size (Rodríguez-García et al. 2006), but the sequencing now indicates a genome size of 77 Mb (S.B. Goodwin and G.H.J. Kema, personal communication) then this estimation of the genetic map length, considering only the large 23 LGs, gives an average of 40.9 kb/cM.

We evaluated the degree of map coverage using the formula $c = e^{-2dn/G}$ (Lange and Boehnke, 1982) and using the lowest of genome size $G = 4303.5$ Kosambi cM, an estimated 69.9% of the genome is within 6.7 cM of one of the 386 linked markers. To obtain an average interval of 10.0 cM for coverage of 95% of the genome of *M. fijiensis*, all 645 markers are required to be on the map.

Table 3.4. Length of linkage group, number of markers, average spacing between markers, largest genetic distance of the genetic linkage map of *Mycosphaerella fijiensis*.

Linkage groups	Length (cM)	Number of markers	Average marker spacing (cM)	Largest distance (cM)
1	192	31	6.1	18.79
2	177	33	5.3	20.89
3	139	32	4.4	17.24
4	116	32	3.6	14.15
5	111	28	4.2	10.33
6	110	13	8.4	18.31
7	108	17	6.3	16.43
8	98	14	7.0	18.89
9	92	17	5.4	16.99
10	74	10	7.4	18.11
11	62	5	12.4	20.43
12	61	7	8.7	14.16
13	61	5	12.2	21.04
14	60	9	6.6	17.00
15	55	10	5.5	9.88
16	54	5	10.8	15.99
17	50	7	7.4	16.90
18	48	5	9.6	14.81
19	48	5	9.6	14.63
20	46	5	9.2	15.21
21	44	9	4.8	9.64
22	38	8	4.7	7.57
23	35	7	5.0	7.86
	1,879 ^a	314 ^a	5.97 ^a	
24-49	702 ^b	2, 3 and 4 (=71) ^b	9.89 ^b	25.29
Total	2,581.5^c	385^c	6.68	

^a Total of all major linkage groups.

^b Total of all minor linkage groups

^c Total of all linkage groups.

Table 3.5. Estimated recombination between the *MAT* locus and twelve markers.

Marker	A:B ^a	Value of P ^b	Recombination frequency	Value LOD
BEACMTG503	23:33	0.181	0.286	2.0
AEAGMAA379	23:34	0.145	0.298	1.7
AEAAMAG559	32:26	0.430	0.328	1.4
BEATMTC109	26:35	0.249	0.361	1.3
BEACMAA549	33:25	0.293	0.379	1.0
BEAGMTT419	29:29	1	0.362	1.0
SSRF84	24:36	0.121	0.617	1.0
AEAAMAC403	38:23	0.054	0.623	1.2
BEAAMGC228	30:30	1	0.650	1.2
BEATMTC103	29:32	0.700	0.656	1.4
AEAAMGC199	30:30	1	0.683	1.8

^a Ratio of parents CIRAD86 (A) to CIRAD139A (B) alleles.

^b Probability of χ^2 values. The null hypothesis of the χ^2 test is that the A:B segregation equals the 1:1 ratio ($\chi^2 \geq 7.7, P \geq 0.01$).

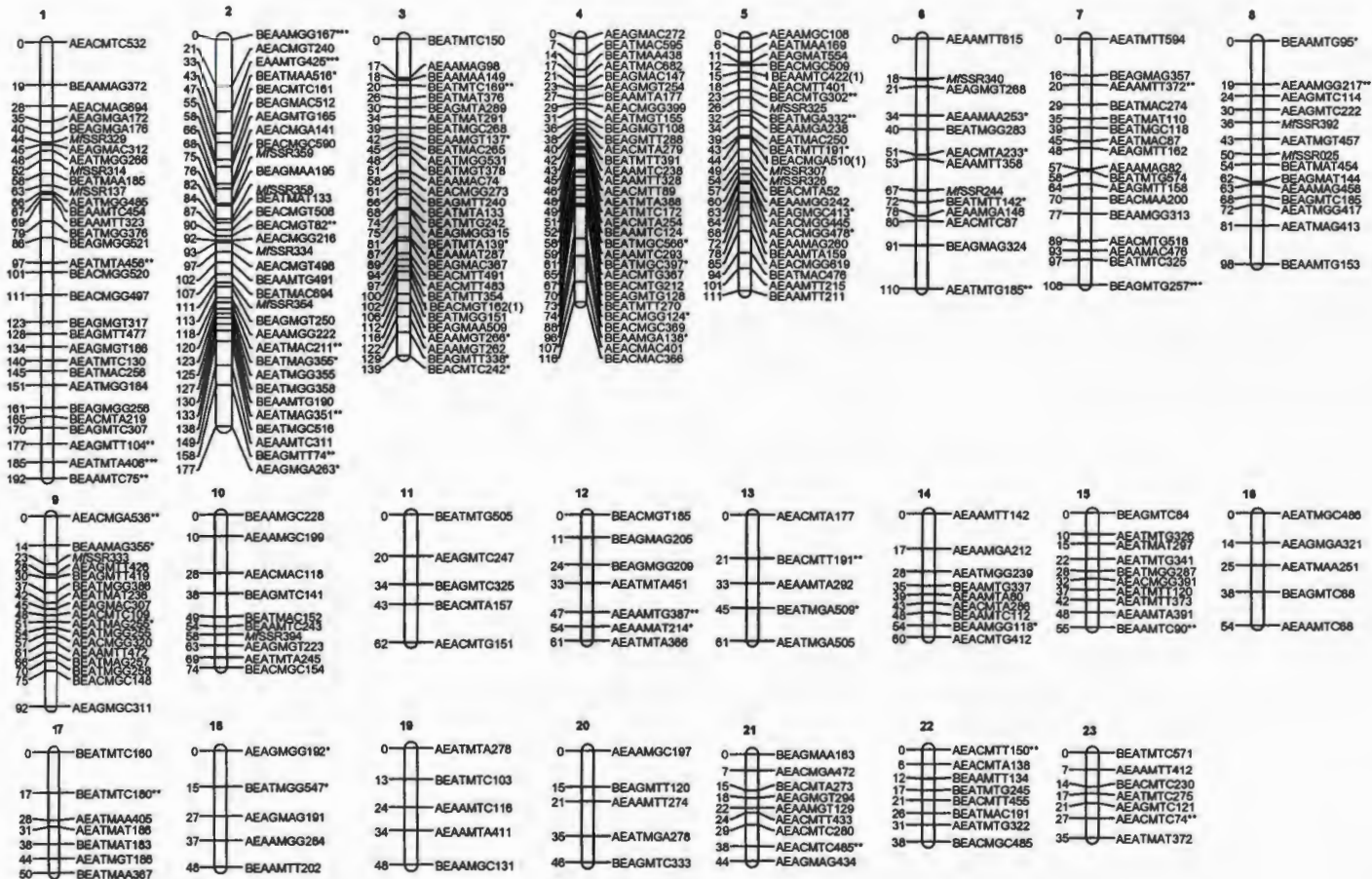


Figure 3.1. The genetic linkage map of *Mycosphaerella fijiensis*. A total of 298 AFLP markers and 16 SSR markers are included in the 23 larger linkage groups analyzed with LOD threshold values minimum of 3.0. Marker distance derived using the Kosambi function is reported in cM and indicated on the left of each linkage group. AFLP and SSR markers were denominated as in Materials and Methods. The numbers between brackets indicates clustering of markers on the linkage groups 3 and 5. Markers with distorted segregation ratios are identified by asterisks to the right of the marker's name are marked with "*" ($P = 0.1$) "***" ($P = 0.05$) and "*****" ($P = 0.01$). The total length of the genetic linkage map was 1879 cM.

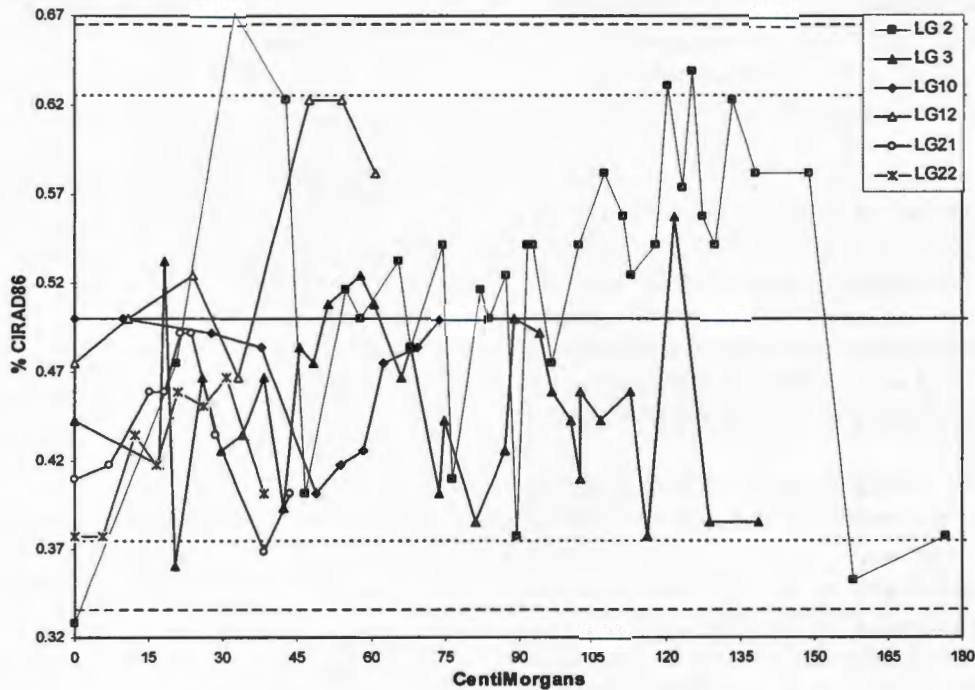


Figure 3.2. Segregation ratios for LGs 2, 3, 10, 12, 21 and 22. The y axis describes the segregation skewed towards the CIRAD86 parent (0.5-1) or the CIRAD139A parent (0-0.5). Boundaries for the 95% (at 0.374 and 0.625) and 99% (0.335 and 0.664) confidence interval around the null hypothesis of Mendelian segregation (1:1) are indicated by *dotted lines*. The x axis describes the distance between the markers of each linkage group and is in cM.

3.4 Discussion

From 38 pairs of *M. fijiensis* isolates evaluated for mating, only 9 produced mature pseudothecia with ascospores and three pairs produced high numbers of pseudothecia. These were selected to develop the F₁ progeny populations of *M. fijiensis*. The progenies derived from crosses between genetically different isolates will be useful in the construction of other genetic linkage maps in order to carry out comparative mapping studies using a common set of markers. This could be important to examine in detail the regions between LGs and could be aligned with the map reported in this study.

Mourichon and Zapater (1990) also reported cases of sexual incompatibility between different isolates of *M. fijiensis*. This may be due to chromosome polymorphisms between different isolates, as previously reported for *M. fijiensis* by Rodríguez-García et al, (2006). Only two *mating types* have been identified for *M. fijiensis* (Mourichon and Zapater, 1990), and two different idiomorphs (MAT1-1 and MAT1-2) are present at the *MAT* locus (Conde-Ferrández et al. 2007).

In this study, we used AFLP and SSR markers and the *MAT* locus to construct the first genetic linkage map of *M. fijiensis*. This genetic linkage map was constructed using 314 markers; it comprises 23 large LGs and covers a length of 1879 cM with an average interval of 5.9 cM between markers. In comparison, the *M. graminicola* linkage genetic map comprises 23 LGs containing a total of 280 markers, the *MAT* locus and the avirulence locus, giving a total length of 1216 cM with an average of 5.3 cM between markers (Kema et al. 2002). The number of LGs in the *M. fijiensis* genetic linkage map was close to those found in *Leptosphaeria maculans* with 21 LGs containing 160 loci (Cozijnsen et al. 2000), *Ascochyta rabiei* with 28 LGs containing 126 loci (Phan et al. 2003), *Cochliobolus sativus* containing in 27 LGs with 134 loci (Zhong et al. 2002) and *Cryphonectria parasitica* with 24 LGs and 144 loci (Kubisiak and Milgroom, 2006).

The number of LG was considerably higher than the estimated number of 8 to 13 chromosomes reported for Mexican strains of *M. fijiensis* (Rodríguez-García et al. 2006). Undoubtedly, when more markers are placed on the map several linkage groups will be expected to merge, especially in the case of the smaller groups. This could be due to an underestimation of the number of chromosomes of the parents and may be resolved when additional markers are added to the map. The discrepancy between chromosome numbers and LGs could also be accounted for by the possibility of co-migration of similar sized chromosomes (Lind et al. 2005). To associate LG and DNA markers with chromosomes, at least one AFLP or SSR marker from each LG could be used as a probe to hybridize with CHEF (contour-clamped homogeneous electric field) blots. In this regard, the genome sequence of *M. fijiensis* which should be available in 2007 indicates that the genome size is ca. 77 Mb (S.B. Goodwin and G.H.J. Kema, personal communication) which is double the estimated size obtained by electrophoretic karyotyping of chromosomal DNA.

Seventy one markers (68 AFLP and 3 SSR) were found on small LGs suggesting that some parts of the genome still have a low marker density.

When all the small LGs are taken into account, the genome size expanded to a total length of 2581.5 cM which is similar to the genetic linkage map of *Heterobasidion annosum* with 2252 cM which contains 39 LGs (Lind et al. 2005) and *Blumeria graminis* with 2114 cM containing 34 LGs (Pedersen et al. 2002).

The 4648.8 cM based on the calculations using the algorithms of Chakravarti et al. (1991) and using the modified estimator Remington's is of 4443 cM and 4303.5 cM, considering 8 and 13 chromosomes, respectively. This value is close to that of a recent report for *Cryphonectria parasitica* with 3356 cM (Kubisiak and Milgroom 2006) and 3241 cM in *Colletotrichum lindemuthianum* (Luna-Martínez et al. 2007) but is larger than 1917 cM in *C. neoformans* (Forche et al. 2000) and 1200 cM for *P. infestans* (Van der Lee et al. 1997).

Skewed marker segregation was previously noted in fungal maps. In the case of *M. fijiensis* 48 AFLP markers showed significant segregation distortions ($P < 0.01$) (Table 3) and were omitted in the mapping analysis; this accounted for 6.8% of the total number of 696 markers. A further 8.9% of markers showed significant distortion (up to $P \geq 0.01$) but were included in the analysis. In comparison with *L. maculans* Cozijnsen et al. (2000) reported that 7% of the markers were distorted. Forche et al. (2000), reported that 33 markers (18%) showed skewed segregation in *C. neoformans* and similarly Zhong et al. (2002) found that 17.4% of skewed AFLP markers in *C. sativus* were distorted. From 56 markers used to create the map of *L. maculans*, 30% showed significant segregation distortion (Pongam et al. 1998). Finally, Lind et al. (2005), reported that in *H. annosum*, 141 (39%) had a segregation distortion from the assumed 1:1 ratio at the 5% significance level. This is a relatively high proportion compared with some other fungal genetic linkage maps.

In our study 1 - 5 markers with distorted segregation were observed on 15 different LG; these markers were found on different regions of individual LG, indicating that no particular LG or large segments of a particular LG showed distortion (Fig. 1). No clustering of skewed segregating markers could be found in our analysis. The level of distortion accepted in this study was determined at $P = 0.01$, this value compares well with those taken for the construction of other fungal genetic linkage maps. In other studies some markers with a significantly distorted segregation were included on the LG forming the genetic linkage map. In *H. annosum* this included all 19 large LG of (Lind et al. 2005), on 7 of the 11 LG in *P. ostreatus* (Larraya et al. 2000), and in *B. lactucae* on 7 of the 12 LG (Sicard et al. 2003).

Several genomic processes could be responsible for this phenomenon; the expression of linked lethal genes; the development of the progeny from parents with different genome sizes and chromosome compliments (Bert et al. 1999); and an accidentally biased selection of the ascospores used for the development of the segregating population (Kerrigan et al. 1992; Larraya et al. 2000). Although the germination rate of ascospores of *M. fijiensis* was high, the parental isolates used in this study showed variation in growth rate and morphology (data not shown).

The physical size to genetic distance of the large 23 LGs was estimated to be approximately 40.9 kb/cM. These results are similar to those of maps developed for other ascomycetes, for example 14.5 kb/cM in *C. parasitica* (Kubisiak and Milgroom, 2006), 23 kb/cM in *Cochliobolus heterostrofus* (Tzeng et al. 1992), 25 kb/cM in *C. sativus* (Zhong et al. 2002) and in the basidiomycetes 13.2 kb/cM for *C. neoformans* (Marra et al. 2004) and 11.1 kb/cM for *H. annosum*. For example, if an average of 70 kb/cM is favorable for map-based cloning (Sicard et al. 2003), this implies that the map generated in this study is well suited for the mapping of genes associated with aggressiveness or oxidative stress resistance.

The segregation ratio for MAT1-1:MAT1-2 (25:36; $\chi^2 = 2.0$; $P = 0.4-0.5$) among the progeny of *M. fijiensis* used for the development of the genetic linkage map is similar (35:26; $\chi^2 = 2.20$; $P = 0.5-0.3$) to that reported for the *M. graminicola* map (Kema et al. 2002). However on the *M. fijiensis* map the *MAT* locus could not be located; similar results have occurred in other studies, for example, in *H. annosum* (Lind et al. 2005) and *B. lactucae* (Hulbert et al. 1988). Probably due to the large genome size, small segregating population analyzed or that the *MAT* locus is localized on minichromosomes or in a difficult to map region of the genome. This problem should be solved by using markers generated by the analysis of expressed sequence tags (EST) and the genome sequence of *M. fijiensis*.

The size of the progeny population is an important factor in the development of a genetic linkage map. The 61 progeny used in this study is a similar number to that of the 61 progeny used to generate the genetic linkage maps of *M. graminicola* (Kema et al. 2002); the 61 progeny used in *M. grisea* (Nitta et al. 1997) and the 60 progeny in *Magnaporthe oryzae* (Luo et al. 2005) and is larger than the mapping populations used to create the maps for *Agaricus bisporus* with 52 haploid offspring (Kerrigan et al. 1992), the 58 single spore progeny used for *L. maculans*, (Cozijnsen et al. 2000), the 40 progeny of *Coprinus cinereus* (Muraguchi et al. 2003) and for

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* where 32 parasexual fusion products were analyzed (Teunissen et al. 2003).

A relatively relaxed minimum LOD value of 3.0 was applied. However many of the LG determined were based on LOD's between 3.0 and 9.0. The LOD values and the maximum recombination frequency of 0.4 used in this study are similar to values reported in previous studies in fungi (Cozijnsen et al. 2000; Pedersen et al. 2002; Phan et al. 2003; Luo et al. 2005) and oomycetes (May et al. 2002).

Regarding the AFLP and SSR markers used in this study, AFLP markers have recently been widely used in the development of linkage genetic maps for both true fungi (Cozijnsen et al. 2000; Jurgenson et al. 2002, Kema et al. 2002; Phan et al. 2003; Lind et al. 2003) and Oomycetes (Hulbert et al. 1988; May et al. 2002; Van der Lee et al. 1997; Sicard et al. 2003). The AFLP analysis is a rapid technique which generates a large number of polymorphic markers to provide the overall framework for the map.

AFLP markers have been found to cluster due to the methods of likelihood used to detect SNP's which often occur in repetitive DNA regions (Qi et al. 1998). We could detect only clustering between two AFLP markers on the LG 2, LG 3 and LG 5. In this study the markers are relatively evenly spread over the LG, spaced at an average 7.0 cM between markers. The non-clustering of AFLP markers is similar to that has been found in similar work (with an average distance between markers of 8.9 to 15.1 cM), for example: *C. neoformans* (Forche et al. 2000), *H. annosum* (Lind et al. 2005), *A. rabiei* (Phan et al. 2003) and *L. maculans* (Cozijnsen et al. 2000). Whereas in *M. graminicola* (Kema et al. 2002), *G. zeae* (Jurgenson et al. 2002) in *B. lactucae* (Sicard et al. 2003) such clustering has been seen (the maps showed an average distance between markers of 2.8 to 5.3 cM). The clustering phenomenon of AFLP markers seems to be associated with high density maps; hence addition of more AFLP markers might reveal clustering in *M. fijiensis* as well.

In our study 32 new SSR markers were developed and used to analyze the segregation among the 61 F₁ progeny; some SSR markers from *M. graminicola* and *M. grisea* were analyzed using the parental isolates (CIRAD86 and CIRAD139A); these were not informative (data not shown). The genomic sequencing of *M. fijiensis*, including 40,000 ESTs is now complete and machine annotation is in progress (S.B. Goodwin and G.H.J. Kema personal communication); this will provide a valuable resource of

non-anonymous DNA markers to increase the density of markers on the genetic linkage map and to assemble contiguous clones (contigs).

EST-SSR can be rapidly developed from *in silico* analysis of EST databases at low cost, and made available for the development of gene-based maps. The high transferability of EST-SSR markers will be useful for comparing synteny between important phytopathogenic fungi which should provide information about the evolution of host-pathogen relationships in closely related species. Examples of the use of SSR markers for the construction of genetic linkage maps in fungi comprises *M. grisea*, where twenty-three SSR markers were integrated into an established genetic linkage map (Kaye et al. 2003); in *A. rabiei*, where 10 SSR markers were added to the map (Phan et al. 2003); in *C. neoformans* where 63 SSR markers were included in the map (Marra et al. 2004) and recently Ma et al. (2006) developed a total of 121 SSR markers, which are evenly distributed over the whole-genome of *M. grisea*. Through bioinformatics analysis using publicly available genome sequence data, microsatellite markers can be identified and developed and may significantly increase the marker density of an already established map and, because of their reproducibility, can be used to compare and integrate different genetic maps (Kaye et al. 2003). A common set of markers is urgently needed to test for synteny among fungal genomes.

M. fijiensis is a major foliar pathogen of banana and the understanding of the molecular and genetic basis of aggressiveness and pathogenicity in the banana-*M. fijiensis* pathosystem is an important research objective. A genetic linkage map is essential to investigate the genetics underlying complex or quantitative trait loci (QTL). For example in *H. annosum*, two of the three QTL for mycelial growth rate were shown to be tightly linked to the intersterility genes S and P (Olson, 2006); in *P. ostreatus*, QTLs controlling growth rate and some important industrial production traits have been found (Larraya et al. 2003). In *Gibberella zeae* Cumagun et al. (2004), identified a QTL associated with pathogenicity and aggressiveness on wheat. The genetic linkage map of the *M. fijiensis* genome will be useful to identify QTL associated with aggressiveness or oxidative stress resistance. Furthermore, this genetic linkage map provides a framework for the recently initiated *Mycosphaerella* genome sequencing project. It will help to assign sequence contigs to chromosomes and guide their ordering and orientation.

Acknowledgments

G. Manzo-Sánchez acknowledges fellowship support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (CONACyT) (No. 128982). This project was financially supported by CONACyT (Project No. 37602-B) and the International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP). We thank Emigdia Alfaro for technical support during the AFLP marker analyses.

References

- Bert PF, Gharmet G, Sourdille P, Hayward MD, Balfourer F** (1999) A high-density molecular map for the rye grass (*Lolium perenne*) using AFLP markers. *Theor Appl Genet* 99: 445–452.
- Carrier, J, Lebrun MH, Zapater M, Dubois C, Mourichon X** (1996) Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol Ecol* 5: 499-510.
- Chakravarti A, Lasher LK, Reefer JE** (1991) A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128:380-390.
- Conde-Ferráez L, Waalwijk C, Canto-Canché B, Kema GHJ, Crous P, James A, Abeln E** (2007) Isolation and characterization of the *mating type* locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana. *Mol Plant Pathol* 8:111-120.
- Cozijnsen AJ, Popa KM, Rolls BD, Purwantara A, Howlett BJ** (2000) Genome analysis of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*: mapping mating type and host specificity loci. *Mol Plant Pathol* 1:293-302.
- Cumagun CJR, Borden R, Jurgenson J, Leslie J, Miedaner T** (2004) Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* 94: 520–526.
- Forche A, Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG** (2000) Development and characterization of a genetic linkage map of *Cryptococcus*

- neiformans* var. *neiformans* using amplified fragment length polymorphisms and other markers. Fungal Genet Biol 31:189–203.
- Fullerton RA, Olsen TL (1995)** Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black sigatoka in banana and plantain. New Zealand J of Crop and Hort Sc 23:39–48.
- Hulbert SH, Ilott TW, Legg EJ, Lincoln SE, Lander ES, Michelmore RW (1988)** Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. Genetics 120:947–958.
- Jurgenson JE, Bowden RL, Zeller KA, Leslie JF, Alexandra NJ, Plattner RD (2002)** A genetic map of *Gibberella zea* (*Fusarium graminearum*). Genetics 160:1451–1460.
- Kaye C, Milazzo J, Rozenfeld S, Lebrun M-H, Tharreau D (2003)** The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. Fung Genet Biol 40:207–214.
- Kema GHJ, Goodwin SB, Hamza S, Verstappen ECP, Cavaletto JR, Van der Lee TAJ, de Weerd M, Bonants PJM, Waalwijk C (2002)** A combined amplified fragment length polymorphism and randomly amplified polymorphism DNA genetic linkage map of *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* leaf blotch pathogen of wheat. Genetics 161: 1497–1505.
- Kerrigan RW, Royer JC, Baller LM, Kohli Y, Horgen PA, Anderson JB (1992)** Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics 133: 225–236.
- Kubisiak TL, Milgroom MG (2006)** Markers linked to vegetative incompatibility (*vic*) genes and a region of high heterogeneity and reduced recombination near the mating type locus (*MAT*) in *Cryphonectria parasitica*. Fung Genet Biol 43: 519–527.
- Lange K, Boehnke M (1982)** How many polymorphic genes will it take to span the human genome? Am J Hum Genet 24:842–845.
- Larraya LM, Alfonso M, Pisabarro AG, Ramirez L (2003)** Mapping of genomic regions (Quantitative Trait Loci) controlling production and

quality in industrial cultures of the edible Basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl Env Microbiol 68:3617-3625.

Larraya LM, Perez G, Ritter E, Pisabarro AG, Ramirez L (2000) Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Appl Env Microbiol 66:5290-5300.

Lind M, Olson A, Stenlid J (2005) An AFLP-marker based genetic linkage map of *Heterobasidion annosum* locating intersterility genes. Fung Genet Biol 42: 519-527.

Luna-Martínez F, Rodríguez-Guerra R, Victoria-Campos M, Simpson J (2007) Development of a molecular genetic linkage map for *Colletotrichum lindemuthianum* and segregation analysis of two avirulence genes. Curr Genetics 51: 109-121.

Luo C-X, Yin LF, Koyanagi S, Farman ML, Kusaba M, Yaegashi H (2005) Genetic mapping and chromosomal assignment of *Magnaporthe oryzae* avirulence genes *AvrPik*, *AvrPiz*, and *AvrPiz-t* controlling cultivar specificity on rice. Phytopathology 95:640-647.

Ma J-H, Wang L, Fena S-J, Lin F, Xiao Y, Pan Q-H (2006) Identification and fine mapping of *AvrPi15*, a novel avirulence gene of *Magnaporthe grisea*. Theor Appl Genet 113: 875-883.

Marín, D.H., Romero, R.A., Guzmán, M., and Sutton, T.B. 2003. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. Plant Dis 87:208-222.

Marra RE, Huang JC, Fung E, Nielsen K, Heitman J, Vilgalys R, Mitchell TG (2004) A genetic linkage map of *Cryptococcus neoformans* variety *neoformans* serotype D (*Filobasidiella neoformans*). Genetics 167:619-631.

May KJ, Whisson SC, Zwart RS, Searle IR, Irwin JAG, Maclean DJ, Carroll BJ, Drenth A (2002) Inheritance and mapping of 11 avirulence genes in *Phytophthora sojae*. Fung Genet Biol 37:1-12.

Mourichon X, et Zapater MF (1990) Obtention *in vitro* du stade *Mycosphaerella fijiensis* forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. Fruits 45:553-557.

- Muraguchi H, Ito Y, Kamada T, Yanagi SO (2003)** A linkage map of the basidiomycete *Coprinus cinereus* based on random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphisms. *Fung Genet Biol* 40: 93-102.
- Neu C, Kaemmer D, Kahl G, Fisches D, Weising K (1999)** Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol Ecol* 8:513-525.
- Nitta N, Farman ML, Leong SA (1997)** Genome Organization of *Magnaporthe grisea*: integration of genetics maps, clustering of transposable elements and identification of genome duplications and rearrangements. *Theor Appl Genet* 95:20-32.
- Olson A (2006)** Genetic linkage between growth rate and the intersterility genes S and P in the basidiomycete *Heterobasidion annosum s. lat.* *Mycol Res* 110: 979-984.
- Pedersen C, Rasmussen SW, Giese H (2002)** A genetic map of *Blumeria graminis* based on functional genes, avirulence genes, and molecular markers. *Fung Genet Biol* 35:235-246.
- Phan HTT, Ford R, Taylor PWJ (2003)** Mapping the mating type locus of *Ascochyta rabiei*, the causal agent of ascochyta of chickpea. *Mol Plant Pathol* 4:373-781.
- Pongam P, Osborn TC, Williams PH (1998)** Genetic analysis and identification of amplified fragment length polymorphism markers linked to the *alm1* avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* 88: 1068-1072.
- Qi X, Stam P, Lindhout P (1998)** Use of locus-specific AFLP markers to construct a high density molecular map in barley. *Theor Appl Genet* 96, 376-384.
- Remington DL, Whetten RW, Liu B-H, O'Malley DM (1999)** Construction of an AFLP genetic linkage map with near complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theor Appl Genet* 98:1279-1292.

- Rivas G-G, Zapater M-F, Abadie C, Carlier J** (2004) Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol Ecol* 13:471-482.
- Rodríguez-García CM, Raigosa-Flores N, Conde-Ferráez L, Peraza-Echeverría L, Canto-Canché B, James-Kay A** (2007) Variation in electrophoretic karyotype among Mexican isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Can J Plant Pathol* 28: 236-241.
- Sicard D, Legg E, Brown S, Babu NK, Ochoa O, Sudarshana P, Michelmore RW** (2003) A genetic map of the lettuce downy mildew pathogen, *Bremia lactucae*, constructed from molecular markers and avirulence genes. *Fung Genet Biol* 39:16-30.
- Stover RH** (1976) Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. *Trop Agri (Trinidad)* 53:111-114.
- Teunissen HAS, Rep M, Houterman PM, Cornelissen BJC, Haring MA** (2003) Construction of a mitotic linkage map of *Fusarium oxysporum* based on *Foxy*-AFLP. *Mol Gen Genomics* 269:215-226.
- Tzeng T-H, Lyngholm LK, Ford CF, Bronson CR** (1992) A restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Genetics* 130: 81-96.
- Van der Lee T, De Witte I, Drenth A, Alfonso C, Govers F** (1997) AFLP linkage map of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet Biol* 21, 278-291.
- Van Ooijen JW, Voorrips RE** (2001) JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van der Lee T, Hornes M, Frijtens A, Pot J, Peleman J, Kiper M, Zabeau M** (1995) AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407-4414.

Zhong S, Steffenson BJ, Martinez P, Ciuffetti LM (2002) A molecular genetic map and electrophoretic karyotype of the plant pathogenic fungus *Cochliobolus sativus*. Mol Plant-Microbe Interac 15:481-992.

CAPITULO 4

Conclusiones Generales

En este estudio se planteó la obtención de poblaciones F_1 de *M. fijiensis* y la selección de una de ellas para ser analizada genéticamente con marcadores moleculares, con la finalidad de desarrollar un mapa genético de ligamiento con base en la segregación de los marcadores AFLP y SSR y el locus MAT.

Con base en los resultados generados de los diferentes estudios experimentales se puede concluir que:

1. Fue posible obtener bajo condiciones *in vitro* tres poblaciones F_1 a partir de cruza entre algunos aislados de *M. fijiensis* originarios de diferentes países y distintos cultivares de banano y plátano con diferente nivel de resistencia a Sigatoka negra. Siendo las primeras que se reportan para este patógeno.
2. Para desarrollar el primer mapa genético de ligamiento de *M. fijiensis* fue seleccionada la población F_1 generada por la cruza entre los aislados CIRAD86 (de Camerún) x CIRAD139A (de Colombia). Se analizó genéticamente mediante la segregación de marcadores de ADN (664 AFLP, 32 SSR) y el locus MAT.
3. Un total de 297 marcadores AFLP y 16 marcadores SSR integraron el mapa genético de ligamiento de *M. fijiensis*, siendo el segundo del género *Mycosphaerella*. Este mapa es similar con los reportados en algunos estudios de hongos fitopatógenos.
4. El número de grupos de ligamiento identificado en este estudio es similar a los reportados en otros ascomicetos. Sin embargo, no fue similar al número de cromosomas que contiene *M. fijiensis*, por lo que surge la necesidad de conocer el cariotipo electroforético de los aislados CIRAD86 y CIRAD139A.

5. El locus MAT no pudo ser mapeado mediante los parámetros utilizados en este estudio, a pesar de que tuvo una segregación 25:36 (MAT1-1:MAT1-1), esto probablemente por que el tamaño del genoma de 77 Mb es superior al de otros Ascomicetos en donde pudo ser mapeado este locus.

6. A partir de los datos generados del análisis de la segregación de los marcadores moleculares se estimó un tamaño de genoma para *M. fijiensis* de 4303.5 cM, siendo uno de los de mayor tamaño reportados, en comparación con otros hongos.

7. Se determinó una densidad entre el tamaño físico y la distancia genética de 40.9 kb/cM, estando dentro del promedio general reportado en mapas genéticos de ligamiento de otros hongos. Este parámetro está dentro del rango aceptable para realizar clonación de genes por mapeo.

CAPITULO 5

Perspectivas

Los aislados de *M. fijiensis* de diferentes países y distintos cultivares que fueron compatibles sexualmente bajo condiciones *in vitro*, tuvieron la capacidad de reproducirse sexualmente bajo las condiciones experimentales del estudio, esto se demostró por su capacidad para producir peritecios fértiles con ascas conteniendo en su interior las ascosporas. Lo anterior demuestra que es factible la utilización de la metodología para estudios posteriores donde se requiera realizar cruizas entre aislados con caracteres deseables.

Las tres poblaciones F₁ generadas en este estudio son las primeras que se reportan para este importante hongo patógeno de bananos y plátanos, por lo que son de gran utilidad para ser utilizadas en estudios genéticos. Este primer mapa puede ser la base para el desarrollo de otro mapa genético de ligamiento más denso que permita realizar estudios de genómica comparativa empleando los mismos marcadores moleculares mapeados en los grupos de ligamiento. Mediante el análisis bioinformático de bases de datos de EST y de la secuencia del genoma de *M. fijiensis* pueden identificarse y desarrollarse nuevos marcadores tipo microsatélites, los cuales permitirían incrementar la densidad del mapa.

En este estudio se desarrolló un mapa genético de ligamiento de *M. fijiensis* formado por 23 GL con base en el análisis de marcadores AFLP y SSR. Este mapa representa el primer avance del conocimiento del genoma de *M. fijiensis* y podría ser utilizado como una base para determinar la organización del genoma y los rearrreglos genómicos. Sin embargo, el número de GL fue considerablemente superior al número estimado de 8 a 13 cromosomas. Por lo tanto, es de importancia conocer el cariotipo electroforético de los aislados usados como padres CIRAD86 y CIRAD139A, con el fin de asociar al menos un marcador para cada GL usándolo como sonda para hibridar con el cromosoma. También, otra actividad será identificar los extremos de los cromosomas mediante secuencias teloméricas para determinar el número aproximado de cromosomas con que cuenta este patógeno.

La generación de más marcadores de ADN ayudaría a desarrollar un mapa más denso, lo cual permitirá tener una mayor cobertura del

genoma analizado. Así como también puede ser que algunos grupos de ligamiento menores (formados por 2 a 4 marcadores) puedan ser incorporados en los grupos de ligamiento mayores. Una alternativa es el uso de la tecnología de marcadores DArT (siglas en inglés: Diversity Arrays Technology); esta puede identificar varios cientos de fragmentos de ADN en un genoma después de su hibridación sobre una plataforma de microarreglos sin necesidad del conocimiento previo de la secuencia del genoma. Hoy en día ya se ha utilizado esta tecnología para el desarrollo de mapas genéticos de ligamiento de alta densidad en algunas plantas, animales y hongos.

Los mapas genéticos de ligamientos de hongos fitopatógenos son una herramienta valiosa para los estudios de genética molecular. Además, son clave para la realización de estudios de genómica comparativa, evolución, clonación de genes de interés, así como también para la búsqueda de locus de características cuantitativas. Algunos mapas genéticos de ligamiento de hongos se han integrado con los mapas físicos.

El locus *MAT* no pudo ser mapeado, sin embargo es probable que si se incrementa el número de individuos de la progenie y el número de marcadores de ADN podría ser mapeado. Esto sucede probablemente por que el tamaño del genoma de aprox. 77 Mb es superior al de otros ascomicetos y que se encuentre localizado sobre minicromosomas o tal vez dentro de una región difícil para mapear.

El mapa genético de ligamiento de *M. fijiensis* podría ser útil para identificar QTLs asociados con agresividad, resistencia a fungicidas o resistencia a estrés oxidativo, ya que se determinó un tamaño físico en comparación a la distancia genética de aproximadamente 37.7 kb/cM, siendo esto favorable para la clonación de genes de interés basada en el mapa. Por otra parte, este mapa es una herramienta que será útil para ordenar el genoma secuenciado de *M. fijiensis*, es decir asignar secuencias a cromosomas y guiar su orden y orientación.

En resumen, la disponibilidad de un mapa genético de ligamiento junto con el conocimiento del cariotipo electroforético, la disponibilidad de las bibliotecas BAC y la cercana secuenciación del genoma de *M. fijiensis* abren la posibilidad de estudiar con detalle a este patógeno. Esto permitirá en un futuro cercano entender a detalle los mecanismos del patógeno para sobrevivir a factores ambientales, tales como a los fungicidas y hospederos

resistentes, así como comprender todos los mecanismos involucrados en el proceso de la patogénesis.

Curriculum vitae

Gilberto Manzo Sánchez nació en Tecomán, Colima, México el día 21 de mayo de 1975. Realizó sus estudios de Ingeniero Agrónomo en la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima durante 1993 a 1998. Cursó sus estudios de Maestría en el área de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima en el periodo de 1998 al 2000. Cuenta con experiencia profesional en la aplicación de marcadores de ADN para el conocimiento de la diversidad genética de hongos fitopatógenos. Laboró académicamente en la U. de Colima de 2001 al 2002. Ingresó en el 2003 al Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas del CICY, desarrollando el proyecto titulado “Construcción de un mapa genético molecular de *Mycosphaerella fijiensis* usando marcadores de ADN”. Durante sus estudios de Doctorado realizó una estancia durante 6 meses en el laboratorio del Dr. Jean Carlier del CIRAD, Francia, donde llevo a cabo cruza en condiciones *in vitro* entre aislados de *M. fijiensis* procedentes de diferentes países y distintos cultivares, obteniendo poblaciones segregantes del hongo. Durante su estancia en Francia también participó en el desarrollo de nuevos marcadores microsatélites. Posteriormente realizó una estancia de 18 meses en el laboratorio de la Dra. June Simpson, en el CINVESTAV Unidad Irapuato, donde analizó mediante marcadores AFLP una población F₁ de *M. fijiensis* y desarrolló el primer mapa genético de ligamiento construido para este hongo.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

LISTA DE PUBLICACIONES

Artículos completos:

- Mario Orozco-Santos, Javier Farías-Larios, **Gilberto Manzo-Sánchez**, and Salvador Guzmán-González. 2000. "Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in México". InfoMusa (FRANCE). 10: 33-37.
- Gilberto Manzo-Sánchez**, Mario Orozco-Santos y Salvador Guzmán-González. 2001. Caracterización morfológica del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro y su desarrollo en medios líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología. 19 (1): 66-71.
- Mario Orozco-Santos, **Gilberto Manzo-Sánchez**, Salvador Guzmán-González, Javier Farías-Larios y L.W. Timmer. 2004. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm, Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología. 22 (3): 423-428.
- Gilberto Manzo-Sánchez**, Blondy Canto-Canche y Andrew James. 2005. Hongos patógenos: Enemigos versátiles. Ciencia vol. 56 no. 3: 71-75.
- Gilberto Manzo-Sánchez**, Salvador Guzmán-González, Cecilia Mónica Rodríguez-García, Andrew James y Mario Orozco-Santos. 2005. Biología de *Mycosphaerella fijiensis* y su interacción con *Musa* spp. Revista Mexicana de Fitopatología. 23 (1): 87-96.
- Miguel Juan Beltrán-García, **Gilberto Manzo-Sánchez**, Carlos Arias y Tetsuya Ogura. 2007. Catalasas de Hongos Fitopatógenos: ¿Factor de Virulencia y Resistencia a los Fungicidas?. Revista Mexicana de Fitopatología 24 (1): 50-58.
- Gilberto Manzo-Sánchez**, Elizabeth Ortiz-Vázquez, Andrew James y June Simpson. 2007. El mapeo en genomas de hongos fitopatógenos: aplicaciones y perspectivas. (Aceptado).
- Miguel Juan Beltrán-García, **Gilberto Manzo-Sánchez**, Salvador Guzmán-González, Carlos Arias, Martha Rodríguez and Tetsuya Ogura. 2007. Resistance of *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana and plantain to oxidative stress. (Sometido a la Revista *FEMS Microbiology Letters*).
- Manzo-Sánchez G.**, Zapater M.F., Luna-Marínez F., Carlier J., James A.C. and Simpson J. 2007. Construction of a genetic linkage map for *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak disease of

- banana. (En preparación para someterlo a la Revista *Current Genetics*).
- Rocío Nadal-Medina, **Gilberto Manzo-Sánchez**, José Orozco-Romero, Mario Orozco-Santos y Salvador Guzmán-González. 2007. Diversidad genética de bananos y plátanos usando marcadores RAPD (En Preparación para someterlo a la Revista *Chapingo serie Horticultura*).
- Mendoza-Cal A., **Manzo-Sánchez, G.**, Ortiz.Vázquez, E. 2007. Naringinase production by *Aspergillus niger* using grapefruit peel in SSF. (En Preparación para someterlo a la Revista *Enzyme and Microbial Technology*).
- Miguel Angel Flores-Virgen, Javier Farías-Larios, Salvador Guzmán-González Mario Orozco-Santos y **Gilberto Manzo-Sánchez**. 2007. Diversidad genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* raza 1 de la región Pacífico-Centro de México usando marcadores RAPD. (En preparación para someterlo a la revista *Fitopatología Brasileira*).
- Mario Orozco-Santos, Gil Virgen-Calleros, Francisco Arias-Suárez, Carlos González-Rivas, Miguel Angel Flores-Virgen, Javier Farías-Larios, **Gilberto Manzo-Sánchez**, y Salvador Guzmán-González. 2007. Identificación de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* en la región Pacífico-Centro de México. (En preparación para someterlo a la revista *Mexicana de Fitopatología*)
- Gonzalez-Esquer C.R., Beltrán-García M., Ogura T. and **Manzo-Sanchez G.** 2007. The antioxidant response in banana (*Musa* sp.) cv. grande naine after wounding. (En preparación para someterlo a la revista *Fitopatología Brasileira*)

Resúmenes en revistas:

- Beltran-Garcia, M.J., Ogura, T., **Manzo, G.**, Arias, C. and Rodriguez M. 2004. Catalases of Black Sigatoka Causal Agent as Resistant Factor to Fungicides. *Free Radical Biology & Medicine* 36:S119 Suppl. 1.
- Beltran-Garcia M.J., **G. Manzo-Sanchez**, C.R. Gonzalez-Esquer, and T. Ogura. 2006. Catalase and peroxidase activities in grand naine (Cavendish) banana leaves induced after mechanical wounding. *Free Radical Research* 40:S98 Suppl. 1.
- Beltran-Garcia M.J., **G. Manzo-Sanchez**, E. Garcia-Torres, T. Ogura, and Z. Ravelo-Soto. 2006. Involvement of catalase activity on sensitivity to fungicides in the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, the causal

agent of black Sigatoka in banana plants. Free Radical Research 40:S150 Suppl. 1.

Resúmenes:

Mario Orozco-Santos, **Gilberto Manzo-Sánchez**, Salvador Guzmán-González, L.W. Timmer. Morfología y Patógenecidad de *Colletotrichum* spp., Causante de la Antracnosis de los Cítricos en México. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Puerto Vallarta, Jalisco, del 9 al 13 de julio de 2000.

Gilberto Manzo-Sánchez, Mario Orozco-Santos, Salvador Guzmán-González, Andrew James y June Simpson W. Diversidad Genética de Aislados de *Mycosphaerella fijiensis* de la Región de Colima Determinada por Marcadores RAPDs. XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Puerto Vallarta, Jalisco, del 9 al 13 de julio de 2000.

Mario Orozco-Santos, Gil Virgen-Calleros, Francisco Arias-Suárez, Carlos González-Rivas, **Gilberto Manzo-Sánchez** y Salvador Guzmán-González. Situación Actual de la Marchitez por *Fusarium* spp., en Curcubitáceas de la Región Pacífico-Centro de México. XXVIII Congreso Nacional de Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C., ITESM, Querétaro, Querétaro, del 15 al 18 de Julio de 2001.

Gilberto Manzo-Sánchez, Mario Orozco-Santos, y Salvador Guzmán-González. Uso de Microsatélites Para Determinar la Diversidad Genética de *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal de la Sigatoka Negra del Plátano. XXVIII Congreso Nacional de Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C., ITESM, Querétaro, Querétaro, del 15 al 18 de Julio de 2001.

Gilberto Manzo-Sánchez, Laura Conde-Ferráez, Blondy Canto-Canche y Andrew James. Selección Molecular de Aislados de *Mycosphaerella fijiensis* Para Realizar Cruzas Preliminares y Construir un Mapa Genético. V Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Querétaro, Querétaro, del 5 al 9 de octubre de 2003.

Laura Conde-Ferráez, **Gilberto Manzo-Sánchez**, Blondy Canto-Canche y Andrew James. "Aislamiento de los Genes MAT del Patógeno Foliar *Mycosphaerella fijiensis*". V Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Querétaro, Querétaro, del 5 al 9 de octubre de 2003.

Manzo-Sánchez, G., Orozco-Santos, M. y Guzmán-González, S. Diversidad Genética de *Mycosphaerella fijiensis* en Bananos

- Cultivados con Diferente Manejo. XVI Reunión Internacional de la Asociación para la cooperación en investigaciones Bananeras en el Caribe y en América Tropical (ACORBAT) 26 de Septiembre al 1° de Octubre 2004. Oaxaca, México. pp. 154-158.
- Orozco-Santos, M., Orozco-Romero, J., Velásquez-Monreal, J., **Manzo-Sánchez, G.** y Guzmán-González, S. Enfermedades de Bananos y Plátanos (*Musa spp.*) en México. XVI Reunión Internacional de la Asociación para la Cooperación en Investigaciones Bananeras en el Caribe y en América Tropical (ACORBAT) 26 de Septiembre al 1° de Octubre 2004. Oaxaca, México. pp. 127-134.
- Manzo-Sánchez G.**, Zapater M.-F, James A. y Carlier J. Obtención de las Primeras Poblaciones F₁ de *Mycosphaerella fijiensis* Para el Mapeo Genético. XVI Reunión Internacional de la Asociación para la cooperación en investigaciones Bananeras en el Caribe y en América Tropical (ACORBAT) 26 de Septiembre al 1° de Octubre 2004. Oaxaca, México. pp. 141-145.
- Gilberto Manzo-Sánchez**, Marie-Françoise Zapater, Andrew James and Jean Carlier. "Constitution of F₁ Populations for Genetic Mapping of the Ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis*, Causal Agent of Black Sigatoka Disease in Banana". Congreso Nacional / Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Boca de Río, Veracruz del 25 al 28 de julio de 2004.
- Gilberto Manzo-Sánchez**, Laura Conde-Ferráez, Nestor Raigosa-Flores, Diana Guillén-Maldonado, Blondy Canto-Canche, Leticia Peraza-Echeverría, Cecilia Mónica Rodríguez-García y Andrew James. "Avances de Investigación Sobre Genómica de *Mycosphaerella fijiensis*". XXXI Congreso Nacional / VI Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Boca de Río, Veracruz del 25 al 28 de julio de 2004.
- Manzo-Sanchez G.**, Zapater M.F., Simpson J., James A.C. y Carlier J. "Obtención de poblaciones F₁ y construcción de un mapa genético de *Mycosphaerella fijiensis* usando marcadores AFLP y SSR". VI Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos. Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C. Morelia, Michoacán del 23 al 26 de Octubre de 2005.
- Ana Elisa García-Torres, **Gilberto Manzo-Sánchez**, Andrew James-Kay, June Simpson, Miguel Juan Beltrán-García y Zaira Ravelo-Soto. Análisis de la variabilidad genética por microsatélites en distintos aislados de *Mycosphaerella fijiensis* y su relación con la respuesta antioxidante. VIII Congreso Internacional / XXXIII Congreso

Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Manzanillo, Colima, 17 al 20 de Julio de 2006.

Daniel Tuesta-Popolizio, **Gilberto Manzo-Sánchez**, Tetsuya Ogura y Miguel Juan Beltrán-García. Selección de bacterias epifitas de hojas de plátano variedad Cavendish con actividad de quitinasa como alternativa para el biocontrol de la Sigatoka negra. VIII Congreso Internacional / XXXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Manzanillo, Colima, 17 al 20 de Julio de 2006.

Gilberto Manzo-Sánchez, Marie-Françoise Zapater, Francisco Luna-Martínez, June Simpson, Laura Conde-Ferráez, Jean Carlier y Andrew James: 2006. Construcción de un mapa genético de ligamiento del ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra del plátano. VIII Congreso Internacional / XXXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, Manzanillo, Colima, 17 al 20 de Julio de 2006.

M.J. Beltran-Garcia, Z. Ravelo-Soto, **G. Manzo-Sanchez**, and T. Ogura. 2006. Oxidative stress response of the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of banana to hydrogen peroxide and other stress conditions. 8th International Mycological Congress, 20-25 August, 2006, Cairns, Queensland, Australia.

Manzo-Sánchez, G., Zapater, M.-F, Luna-Martínez, F., Simpson, J., Carlier J. y James-Kay, A. 2006. Construcción de un mapa genético de ligamiento de *Mycosphaerella fijiensis*. 2006. XVII Reunión Internacional de la ACORBAT. 15 al 20 de Octubre de 2006. Joinville-Santa Catarina, Brasil. 662-667 pp.

James A.C., Canto-Canche B., Conde-Ferraez L., Rodriguez-Garcia C., Peraza-Echeverria L., Raigosa N., **Manzo-Sánchez G.**, Peraza-Echeverria S. and Flores-Islas I. 2007. Advances in genomics of the most important fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis* (Black Sigatoka). Plant & Animal Genomes XV Conference, San Diego, CA 13-17 January 2007.

M.J. Beltran-Garcia, Z. Ravelo-Soto, **G. Manzo-Sanchez**, and T. Ogura. 2006. Oxidative stress response of the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of banana to hydrogen peroxide and other stress conditions. 8th International Mycological Congress, 20-25 August, 2006, Cairns, Queensland, Australia.

Manzo-Sánchez, G., Zapater, M.-F, Luna-Martínez, F., Simpson, J., Carlier J. y James-Kay, A. 2006. Construcción de un mapa genético de ligamiento de *Mycosphaerella fijiensis*. 2006. XVII Reunión

Internacional de la ACORBAT. 15 al 20 de Octubre de 2006. Joinville-Santa Catarina, Brasil. 662-667 pp.

James A.C., Canto-Canche B., Conde-Ferraez L., Rodriguez-Garcia C., Peraza-Echeverria L., Raigosa N., **Manzo-Sánchez G.**, Peraza-Echeverria S. and Flores-Islas I. 2007. Advances in genomics of the most important fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis* (Black Sigatoka). Plant & Animal Genomes XV Conference, San Diego, CA 13-17 January 2007.

Capítulos en libros:

Mario Orozco-Santos, **Gilberto Manzo-Sánchez**, Guadalupe Garza-López y Salvador Guzmán-González. Enfermedades del Plátano (*Musa* spp.) en México. En: Enfermedades y Normatividad de Frutales del Pacífico Centro-Sur de México. pp 24-48. Ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Primera Edición, Febrero de 2001. 179 p. ISBN: 968-5284-06-7.

Folletos técnicos:

Salvador Guzmán González y **Gilberto Manzo Sánchez**. Micropropagación de plantas hermafroditas de papaya Red Lady. Folleto informativo. Edit. Talleres Gráficos Multicolor S.A. Colima, Col. 12 pp, Enero de 2003.

