



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE
LA BIOMASA DE *Mycosphaerella fijiensis* EN
PLANTACIONES DE BANANO DE TEAPA,
TABASCO**

Tesis que presenta

YASMÍN ABRIL SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "CUANTIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DE LA BIOMASA DE *Mycosphaerella fijiensis* EN PLANTACIONES DE BANANO DE TEAPA, TABASCO" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 5 de julio de 2012.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Nombre: Q.F.B. Yasmín Abril Sánchez Rodríguez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto de tesis titulado "Cuantificación por PCR en tiempo real de la biomasa de *Mycosphaerella fijiensis* en plantaciones de Teapa, Tabasco" bajo la dirección del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por permitirme el uso de sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo, al CONACyT por la beca que me otorgó como estudiante (240263).

A mi asesor de tesis, el Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por la orientación y por todo lo aprendido a lo largo de la realización de este trabajo.

A la Dra. Blondy Canto Canché por su disposición, ayuda brindada y por darme la oportunidad de ser parte del proyecto FORDECYT clave 116886 del cuál este trabajo forma parte.

A mi comité tutorial a la Dra. Blondy Canto Canché, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Enrique Sauri Duch por las recomendaciones y ayuda brindada para el enriquecimiento de la tesis.

A mis revisores de tesis el Dr. Ignacio Islas Flores, Dra. Blondy Canto Canché, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Enrique Sauri Duch y al Dr. Jairo Cristóbal Alejo por sus comentarios, consejos y por dedicar su tiempo a la revisión de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Garrido y a la I. A. Elizabeth Hernández por su ayuda durante la colecta de material biológico en el estado de Chiapas.

Al Dr. Luciano Martínez Bolaños y al Ing. Eduardo Gutiérrez Jiménez, por la ayuda brindada durante la colecta del material biológico en el estado de Tabasco.

A la Ing. Lilia Suárez por autorizarnos coleccionar material biológico en la Plantación San Fernando y al responsable de la Plantación San Juanito.

Al Dr. Roberto Vázquez, M.C. Miguel Tzec Simá y a la Biol. Erika Chan, por su apoyo técnico, así como en la facilitación de materiales y reactivos; y al grupo de banano de la Unidad de Biotecnología del CICY.

A la M.C. Ligia Brito Argáez, por sus consejos, sugerencias y por su amistad.

A mi amiga QFB. Mayra Díaz Brito por todo el apoyo incondicional, ánimo y ayuda para concluir esta meta tan importante.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 06 de la UBBMP, Carmelita, Deysi, Yeny, Geovani, Manuel, Mayra, por su apoyo y por hacerme disfrutar de todos los momentos durante mi paso por el laboratorio.

A mis amigos de la maestría Ricardo, Felipe, Mike, mis comadres Abril, Bety, Mayra, Katy; y amigos del grupo de banano de la Unidad de Biotecnología por emprender juntos esta aventura y por los buenos momentos compartidos.

DEDICATORIAS

A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mis padres Adolfo Sánchez y Sánchez y Clara María Rodríguez Sánchez por ser mi ejemplo de vida, por su amor, su esfuerzo en mi educación y su ayuda en todo lo que al alcance de su mano ha estado.

A mis hermanos Cindy Danelli Sánchez Rodríguez y Adolfo Rene Sánchez Rodríguez por todo el apoyo brindado, por su comprensión y cariño.

A toda mi familia por apoyarme y preocuparse por mi bienestar, por sus consejos y por ser el respaldo de mi vida.

A todos mis amigos por su apoyo y su amistad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1 <i>MUSASP</i>	5
1.2 IMPORTANCIA DEL BANANO.....	6
1.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS REGIONES PRODUCTORAS DE BANANO EN MÉXICO	6
1.4 PROBLEMAS FITOSANITARIOS EN LAS PLANTACIONES BANANERAS.....	7
1.5 <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	8
1.5.1 CICLO DE VIDA DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	10
1.5.2 INFECCIÓN Y SINTOMATOLOGÍA.....	12
1.6 ESTRATEGIAS DE CONTROL	14
1.7 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FUNGICIDAS.....	15
1.8 MANEJO DE LA SIGATOKA NEGRA EN MÉXICO	16
1.9 RESISTENCIA DE <i>M. FIJENSIS</i> A LOS FUNGICIDAS	17
1.10 ESTRATEGIAS PARA DETERMINAR LA BIOMASA DE FITOPATÓGENOS.....	18
1.11 CARACTERÍSTICAS Y APLICACIÓN DE LA PCR EN TIEMPO REAL.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21

JUSTIFICACIÓN.....	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
BIBLIOGRAFÍA.....	25
CAPÍTULO II	32
CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> POR PCR EN TIEMPO REAL, EN HOJAS DE BANANO COLECTADAS EN PLANTACIONES DE TEAPA, TABASCO CON DIFERENTE MANEJO DE FUNGICIDAS.....	32
2.1 INTRODUCCIÓN.....	32
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.2.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL EN TEAPA, TABASCO.....	33
2.2.2 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	35
2.2.3 EXTRACCIÓN DEL ADNG DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	36
2.2.4 EXTRACCIÓN DEL ADNG A PARTIR DE LAS HOJAS DE BANANO COLECTADAS EN LAS PLANTACIONES.....	36
2.2.5 AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL DEL GEN DE LA β -TUBULINA DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> A PARTIR DEL ADNG OBTENIDO DE LAS HOJAS DE BANANO INFECTADAS CON SIGATOKA NEGRA.....	37
2.2.6 CUANTIFICACIÓN DEL ADNG DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> POR PCR EN TIEMPO REAL.....	38
2.2.7 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	38
2.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
2.3 RESULTADOS.....	39

2.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE LAS HOJAS DE BANANO	39
2.3.3 CURVA ESTÁNDAR PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE ADN DE <i>M. FIJENSIS</i> POR PCR EN TIEMPO REAL	40
2.3.4 CURVA ESTÁNDAR PARA DETERMINAR LA BIOMASA DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> ..	43
2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA DE <i>M. FIJENSIS</i> EN LAS HOJAS DE BANANO ENFERMAS DE SIGATOKA NEGRA	45
2.4 DISCUSIÓN	52
BIBLIOGRAFÍA.....	55
CAPÍTULO III	57
CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DE <i>M. FIJENSIS</i> EN HOJAS DE BANANO COLECTADAS EN 2011 EN PLANTACIONES DE BANANO CON DIFERENTE MANEJO DE FUNGICIDAS Y LOCALIZADAS EN TEAPA, TABASCO.....	57
3.1 INTRODUCCIÓN.....	57
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.	58
3.2.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL	58
3.2.2 CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DE <i>M. FIJENSIS</i> EN LAS MUESTRAS COLECTADAS. ...	59
3.3 RESULTADOS.	60
3.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DEL MATERIAL VEGETAL COLECTADO	60
3.3.2 CURVA ESTÁNDAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ADN DE <i>M. FIJENSIS</i> POR PCR EN TIEMPO REAL.	61
3.3.3 DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i> EN EL MATERIAL VEGETAL COLECTADO	62

3.4 DISCUSIÓN.....	69
CAPÍTULO IV.....	74
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	74
4.1 CONCLUSIONES.....	74
4.2 PERSPECTIVAS.....	75
4.3 ANEXOS.....	76

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Diagrama de la estrategia experimental utilizada en este trabajo.	24
Figura 2.1 Diseño de las áreas de colecta del material vegetal en las plantaciones de Teapa, Tabasco.....	33
Figura 2.2 Ubicación geográfica de las localidades muestreadas	35
Figura 2.3 Imágenes de geles de 1% de agarosa mostrando el perfil de bandeo del ADN después de haber sido sometido a electroforesis.	40
Figura 2.4 Curva estándar generada por PCR en tiempo real.....	41
Figura 2.5 Imagen de un gel de 2% de agarosa en el cual se separaron por electroforesis los productos amplificados por PCR en tiempo real.....	42
Figura 2.6 Curva estándar que relaciona la cantidad de ADNg de <i>M. fijiensis</i> con cantidad de micelio de <i>M. fijiensis</i>	43
Figura 2.7 Análisis electroforético en gel de 1% de agarosa del ADN de <i>M. fijiensis</i> obtenido a partir de diferentes cantidades de micelio..	44
Figura 2.8 Comparación gráfica de la biomasa total de <i>M. fijiensis</i> en las muestras colectadas en la Plantación de manejo semi intensivo.	46
Figura 2.9 Comparación gráfica de la biomasa de <i>M. fijiensis</i> en las muestras de hojas de banano colectadas en cada cuadrante de la Plantación con manejo Semi intensivo.	47
Figura 2.10 Comparación gráfica de la biomasa total de <i>M. fijiensis</i> en las muestras colectadas en la Plantación de manejo intensivo.	48
Figura 2.11 Análisis de la biomasa de <i>M. fijiensis</i> en cada uno de los cuadrantes de la plantación con manejo intensivo de fungicidas.	49
Figura 2.12 Comparación gráfica de la biomasa total de <i>M. fijiensis</i> presente en cada una de las plantaciones con diferente manejo.....	50

Figura 2.13 Representación gráfica de la biomasa de <i>M. fijiensis</i> cuantificada en las muestras colectadas en la zona rural.	51
Figura 3.1 Imágenes de plantaciones de banano del municipio de Teapa, Tabasco.....	59
Figura 3.2 Análisis en gel de agarosa de 1% de la integridad del ADN extraído de las hojas de banano enfermas de Sigatoka negra.	61
Figura 3.3 Curva estándar generada con los valores de C_t vs el log de las cantidades de ADN _g de <i>M. fijiensis</i>	62
Figura 3.4 Comparación gráfica de la biomasa total de <i>M. fijiensis</i> en las muestras de banano colectadas en las diferentes etapas de aplicación de fungicida en la Plantación de manejo semi intensivo.	63
Figura 3.5 Comparación gráfica de la biomasa de <i>M. fijiensis</i> en las muestras de hojas de banano colectadas en cada cuadrante de la Plantación de manejo semi intensivo.....	64
Figura 3.6 Comparación gráfica de la biomasa total de <i>M. fijiensis</i> contenida en las muestras colectadas en la Plantación de manejo intensivo.....	65
Figura 3.7 Comparación gráfica de la biomasa de <i>M. fijiensis</i> contenida en las muestras de hojas de banano colectadas en cada cuadrante de la Plantación de manejo intensivo.	66
Figura 3.8 Comparación gráfica de la biomasa total de <i>M. fijiensis</i> presente en cada una de las plantaciones.....	67
Figura 3.9 Gráfica que muestra la biomasa de <i>M. fijiensis</i> en las muestras colectadas en la zona rural.	68

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Características de los síntomas de la enfermedad de la Sigatoka negra.....13

ABREVIATURAS

L	Litro
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
ton	Tonelada
kg	Kilogramo
g	Gramo
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
ng	Nanogramo
pg	Picogramo
pb	Pares de base de núcleotidos
Km	Kilómetro
m	Metro
cm	Centímetro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
Ha	Hectárea
Ct	Ciclo umbral
min	Minuto
$^{\circ}$ C	Grados Celsius
M	Concentración molar
μ M	Concentración micromolar

mM	Concentración milimolar
rpm	Revoluciones por minuto
N	Latitud norte
WO	Longitud poniente
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ARN	Ácido ribonucleico
PDB	Potato dextrosa broth (medio papa dextrosa)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
CTAB	Bromuro de cetil trimetil amonio
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

RESUMEN

En el mundo, las plantaciones de banano frecuentemente se ven afectadas por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, inductor de la enfermedad denominada Sigatoka negra, la cual afecta el rendimiento y la calidad del fruto. En el municipio de Teapa, Tabasco para controlar dicha enfermedad realizan aplicaciones semanales de fungicidas sistémicos o de contacto; sin embargo, el número y la cantidad de fungicida que se aplica se basa en criterios empíricos, los cuales no necesariamente son correctos y resultan en la aplicación de grandes dosis de fungicidas, incrementando el costo de la producción del banano y la contaminación del ambiente.

Dado el interés por encontrar alternativas que permitan un manejo eficiente de *M. fijiensis* y debido a que durante el control de la enfermedad, la sola aplicación de fungicidas hace que el costo de mantenimiento de las plantaciones se incremente hasta el 40%, en este trabajo se utilizó la técnica de PCR en tiempo real para determinar el efecto que tiene la no aplicación de fungicidas (zona rural) o la aplicación intensiva o semi intensiva de fungicidas sobre la biomasa de *M. fijiensis* presente en las plantaciones de *Musa acuminata* cv Enano Gigante, localizadas en el municipio de Teapa, Tabasco. Para ello se cuantificó por PCR en tiempo real, la biomasa de *M. fijiensis* presente en hojas de banano colectadas durante el mes de junio (época de lluvias) del año 2010 y 2011 en plantaciones de banano mantenidas con diferente régimen de aplicación de fungicidas. Los resultados de los muestreos realizados en el año 2010, mostraron que en la plantación con manejo semi intensivo de fungicida, la biomasa de *M. fijiensis* tuvo poca variación antes, durante y después de la aplicación del fungicida y mantuvo valores de entre 8.69 y 10.52 mg/250 g de tejido. En la plantación con manejo intensivo de fungicida se determinó que la biomasa de *M. fijiensis* no se abatió durante la aplicación y mantuvo valores de entre 7.28 y 14.06 mg/250 g de tejido; en contraste, en la zona sin aplicación de fungicida se encontró que la biomasa era de 19.63 mg/250 g de tejido.

El comportamiento de la biomasa de *M. fijiensis* detectada en el muestreo del año 2011 tuvo valores de entre 30.87 y 94.89 mg/250 g de tejido de hoja de banano para la plantación de manejo semi intensivo y para la plantación de manejo intensivo fue de 45.81 y 96.74 mg/250 g de tejido. En ambas plantaciones se determinó que durante la aplicación del fungicida la biomasa del patógeno disminuyó. En la zona rural sin aplicación

de fungicida, se determinó una biomasa de 28.88 mg/250g de tejido, cantidad de biomasa menor a la encontrada en las plantaciones comerciales. Este comportamiento pudiera deberse a que en la zona rural había un reducido número de plantas de banano, en contraste a lo que ocurre en las plantaciones comerciales; además en la primera había otro tipo de plantas que no están relacionadas con el banano, este tipo de plantas podrían prevenir la existencia de grandes cantidades de inóculo, ya que no son infectadas naturalmente por *M. fijiensis*.

Dado que la técnica de PCR en tiempo real implementada en este trabajo permitió detectar la biomasa de *M. fijiensis* en las hojas de banano colectadas en las plantaciones con diferente manejo de fungicidas, entonces es posible afirmar que la metodología de la PCR en tiempo real es una técnica que puede ser utilizada para determinar el efecto de la aplicación de diferentes fungicidas en el inóculo de *M. fijiensis* en las plantaciones de banano de Teapa, Tabasco. Los resultados obtenidos de este trabajo, junto con los obtenidos por otros grupos que realizan investigación sobre el manejo de la Sigatoka negra permitirán hacer recomendaciones confiables acerca de las cantidades de fungicida que podrían emplearse para mantener bajo control al inóculo de *M. fijiensis*, y con ello prevenir la aparición de cepas resistentes al fungicida.

ABSTRACT

Worldwide, banana plantations are often affected by the ascomycete fungus *Mycosphaerella fijiensis*, inducing the disease called black Sigatoka, which affects both yield and fruit quality. In the municipality of Teapa, Tabasco, producers make weekly applications of systemic or contact fungicides in order to control this disease, but the fungicides' doses and frequency of applications are based on empirical criteria, which are not necessarily correct, and thus, increasing the cost of banana production, as well as causing environmental pollution.

Given the interest in finding alternatives that allow to efficiently manage *M. fijiensis*' infection and that a single application of fungicide can increase a plantation's maintenance costs in over 40%, in this work real-time PCR was used to determine the effect of not applying fungicides (rural area) versus intensive or semi intensive application of these compounds on the accumulated biomass of *M. fijiensis* in *Musa acuminata* cv Grand Nain plantations located in the municipality of Teapa, Tabasco. Hence, *M. fijiensis* biomass was determined in leaves collected during the rainy season (June 2010 and 2011) from banana plantations under different fungicide application regime using real-time PCR. Results from samples collected in June 2010 showed that in plantations under semi intensive fungicide's application, *M. fijiensis* biomass remained at the same level, before, during or after fungicide was applied (range: 8.69 - 10.52 mg/250 g of tissue). In plantations under intensive fungicide's application, *M. fijiensis* biomass did not decrease and presented values between 7.28 and 14.06 mg/250 g of tissue. In contrast, in the area without its application, the pathogen's biomass was 19.63 mg/250 g of tissue.

In the 2011 sampling *M. fijiensis* biomass had values between 30.87 and 94.89 mg/250g of tissue in the plantation under semi intensive management, and 45.81 and 96.74 mg/250g of tissue for that under intensive fungicide's application. In both plantations, application of fungicide decreased the pathogen's biomass. In the rural area (without fungicide's application), we determined a biomass of 28.88 mg/250g of tissue, an amount lower than those found in the commercial plantations. This behavior could be explained by the low number of banana plants in this site, in contrast to the plant density found in commercial plantations. Furthermore, in the former, there were other kinds of plants not related to banana that could be preventing the existence of large amounts of inoculum as

they are not naturally infected by *M. fijiensis*.

Through the use of real-time PCR we were able to detect *M. fijiensis* biomass in banana leaves collected from plantations under different fungicide's management, thence this technique can be used to determine the effect of applying different fungicides on the inoculum of *M. fijiensis* in banana plantations of Teapa, Tabasco. Our results along with those of other groups involved in the management of black Sigatoka will allow making more reliable recommendations on the fungicide's doses that might be used to maintain under control the inoculum of *M. fijiensis* and thereby, preventing the emergence of resistant strains.

INTRODUCCIÓN

El banano se considera la segunda fruta tropical más importante debido a su alto consumo en el mundo, así como por su elevado contenido nutricional consistente en carbohidratos (35%), fibras (6-7%), proteínas, grasas (1-2%), vitaminas (A, B6, C) y minerales (Potasio, Calcio, Hierro, Fósforo) (FAO, 2000). También, los bananos son una fuente básica de alimento para varios países de África, Asia y Latinoamérica. Al igual que otros cultivos de importancia agronómica, las plantaciones de banano enfrentan diversos problemas fitosanitarios. No obstante, el más importante es la enfermedad conocida como Sigatoka negra, desorden inducido por el hongo hemibiotrófico *Mycosphaerella fijiensis*.

M. fijiensis; el cual durante su ciclo de vida se reproduce tanto en forma sexual como asexual, es uno de los patógenos con mayor impacto en la economía de los países productores de banano. La importancia de este patógeno radica en el hecho de que el banano es el cuarto producto agrícola que más se consume en el mundo y sólo es superado por el arroz, maíz y trigo. En algunos países de África por ejemplo, la incidencia de *M. fijiensis* sobre las plantaciones de banano tiene efectos devastadores, pues el fruto es consumido no solo como postre, sino que forma parte fundamental de la dieta básica (Polanco *et al.*, 2002; Orozco-Santos *et al.*, 2001).

A nivel mundial, México es el octavo productor de banano, con una superficie sembrada de 68,173 hectáreas y una producción de 2.2 millones de toneladas anuales de fruto. Los principales estados productores son: Chiapas, Tabasco, Veracruz, Nayarit, Colima, Michoacán, Oaxaca, Jalisco y Guerrero (SAGARPA, 2010).

Tabasco es el segundo estado productor de bananos con una superficie cultivada de 10,636.04 hectáreas y una producción anual de 467,576.47 toneladas de fruto. Teapa es el municipio con mayor producción con 332,387.10 toneladas; en esta región el banano es uno de los cultivos más importantes y junto con la caña de azúcar y el cacao constituye una pieza clave en la economía de la región (SAGARPA, 2010).

La problemática fitosanitaria en la producción de banano en la región de Teapa, Tabasco está representada por enfermedades y plagas causadas por bacterias, virus, hongos y nematodos fitopatógenos, entre otros (Guzmán, 2006). Al igual que en otras regiones del

INTRODUCCIÓN

mundo, en Teapa la enfermedad foliar conocida como Sigatoka negra tiene el mayor impacto económico debido a las pérdidas que causa en la producción de frutos. Dicha enfermedad daña las hojas del banano y en consecuencia reduce la capacidad fotosintética, impidiendo que la planta alcance la floración con un buen desarrollo vegetativo y el número adecuado de hojas funcionales que permita el llenado de los frutos en forma óptima; como resultado las plantas producen racimos con peso por debajo de los estándares de comercialización (Guzmán, 2006).

En las principales áreas de producción comercial de bananos en México el control de *M. fijiensis* se realiza con aplicaciones semanales de mezclas de fungicidas sistémicos o de contacto. En el municipio de Teapa, el máximo de aplicaciones por plantación comercial es de 52 al año (46 de fungicida de contacto y 6 de fungicida sistémico) y se considera que este régimen es intensivo; la disminución de ese número de aplicaciones (hasta 46; 42 de fungicida de contacto y hasta 4 de fungicida sistémico) es considerada de régimen semi intensivo. El número de aplicaciones de fungicidas es un factor determinante para la sanidad de las plantaciones y para mantener bajo control el inóculo de *M. fijiensis*. Sin embargo, el número y la cantidad de fungicida que se aplica se basa en criterios empíricos, los cuales no necesariamente son correctos y resultan en la aplicación de grandes dosis de fungicidas, incrementando el costo de producción del banano y la contaminación del medio ambiente. Por ello, es necesario generar información que permita elaborar programas de aplicación de fungicidas que se basen en la cantidad de patógeno presente en las plantaciones, en su sensibilidad/tolerancia a fungicidas y no solo en criterios arbitrarios.

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real permite cuantificar la biomasa de diversos patógenos presentes en el hospedero; es por ello que en este estudio se utilizó esta metodología con el propósito de determinar la cantidad de inóculo de *M. fijiensis* que está presente en muestras de banano colectadas en Teapa, Tabasco, en plantaciones que se mantienen bajo regímenes de aplicación intensiva o semi intensiva de fungicidas o solo con manejo rural. Con dicho propósito, a partir del ADN_g extraído de hojas de banano enfermas de Sigatoka negra y que fueron colectadas en las plantaciones con diferente manejo en la aplicación de fungicidas, se amplificó y cuantificó por PCR en tiempo real al gen de la β -tubulina de *M. fijiensis*.

La cuantificación del gen de la β -tubulina se utilizó como criterio para determinar la cantidad de biomasa de *M. fijiensis* presente en las plantaciones estudiadas. La determinación precisa de la cantidad de inóculo de *M. fijiensis* servirá, de ser necesario para proponer modificaciones al número, formulación y frecuencia de los fungicidas que se aplican en la zona productora de banano en Teapa, Tabasco. Dicha información servirá además para elaborar programas de orientación a los productores de plátano donde se indique si la constante aplicación de fungicidas es un programa que a largo plazo realmente permitirá abatir la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

BIBLIOGRAFÍA

Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. (2010). Bananos. <http://faostat.fao.org/> (consultado en agosto 2011).

Guzmán M. (2006). Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil, 83-91.

Orozco Santos M., Farias L., Manzo G., Guzmán S. (2001). La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en México, INFOMUSA, 10: 33-37.

Polanco T., Carlier J., Zapater F. Diagnóstico, distribución y aislamiento de *Mycosphaerella* presentes en musáceas de República Dominicana. (2002). Centro Agronómico Tropical y Enseñanza. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, 64: 62-66.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2010). <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (consultado en enero 2012).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 *Musa* sp.

Los bananos y plátanos son plantas monocotiledóneas, herbáceas, poliploides, perennes y están bien adaptadas a las regiones tropicales y subtropicales. En plátanos y bananos se pueden distinguir tres partes importantes: el corno con hijuelos y el sistema radical, el pseudotallo con el sistema foliar y el racimo o inflorescencia (Simmonds, 1962). Plátanos y bananos forman parte del género *Musa* en la familia *Musaceae*, orden *Zingiberales*, subclase *Zingiberidae*, clase *Liliopsida* y división *Magnoliophyta* (Novak, 1992).

La familia *Musaceae* está constituida por los géneros *Musa* y *Ensete*. El género *Ensete* se reproduce por semilla, es de uso ornamental y hábitat subtropical. El género *Musa* comprende a cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa* (Stover y Simmonds, 1987). La sección *Eumusa* es la de mayor importancia económica y distribución geográfica, ya que en ella se incluyen los bananos y plátanos comestibles.

Dos especies diploides, *Musa acuminata* Colla (genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (genoma B), son los ancestros comunes de todos los cultivares de plátanos y bananos triploides y tetraploides conocidos. Dadas las características genéticas de bananos y plátanos, en la actualidad, estos se clasifican en grupos que indican la contribución genotípica y el grado de ploidía con que está constituido cada clon o cultivar (Simmonds y Shepherd, 1955).

Por conveniencia se denomina con la letra "A" a los que presentan características semejantes a *M. acuminata* y con "B" a los de *M. balbisiana*. Las variedades son híbridos complejos (diploides, triploides y tetraploides) formados por el cruzamiento de *M. acuminata* y *M. balbisiana*. El cruzamiento de *M. acuminata* con *M. acuminata* y *M. acuminata* con *M. balbisiana* produce cultivares diploides (AA, BB, híbridos AB), triploides (AAA, AAB, ABB) y tetraploides (AAAA, AAAB, AABB, ABBB). En general, los híbridos que poseen una alta proporción de *M. acuminata* producen frutos dulces, mientras que los

CAPÍTULO I

que poseen una alta proporción de *M. balbisiana* producen frutos con alto contenido de almidón.

Desde el punto de vista comercial el grupo principal es el triploide de *Musa acuminata* (AAA) que contiene los clones comerciales más difundidos.

Los grupos taxonómicos más importantes que se cultivan en México son: AAA (Enano Gigante y Valery, Subgrupo Cavendish), AAB (Macho y Dominico, Subgrupo Plantain), AAB (Manzano), ABB (Pera o Cuadrado) y AA (Dátil) (Orozco-Santos y Orozco-Romero, 2004).

1.2 Importancia del banano

El banano representa el cuarto cultivo más importante del mundo, su consumo solo se encuentra por debajo del arroz, trigo y maíz (Bompard y Sharrock, 2000). Es consumido extensamente en los trópicos, donde se cultiva y en las zonas templadas es apreciado por su sabor, gran valor nutricional y por su disponibilidad durante todo el año. Tan solo en el Centro y Oeste de África constituye la fuente principal de alimentación de 270 millones de personas (Orozco-Romero *et al.*, 2006).

La producción anual mundial asciende a los 74 millones de toneladas, siendo los países de América Latina los principales exportadores de fruta fresca hacia los Estados Unidos y Europa; con tan solo el 15% de la producción ya que el resto se destina al consumo local e industrialización (FAO, 2010).

Los principales países productores son: India, Brasil, Ecuador, Colombia, Tanzania Indonesia, Filipinas y China entre otros. México es el octavo productor mundial con 2.2 millones de toneladas anuales (FAO, 2010).

1.3 Características de las regiones productoras de banano en México

En México las tres regiones productoras de banano son: Región del Golfo de México que ocupa el 43% de la superficie nacional cultivada, Región del Pacífico Centro con el 24% y Región del Pacífico Sur con un 30% (Orozco-Romero *et al.*, 2006).

Región Golfo de México. Esta región presenta características de clima cálido húmedo con

una precipitación pluvial anual de 1,700 a 3,900 mm y comprende los estados de Tabasco, Veracruz y Oaxaca. El estado más lluvioso es Tabasco (2,300 a 3,900 mm) con precipitaciones durante casi todo el año, 0 a 2 meses secos (menos de 60 mm de lluvia mensual), temperatura media anual de 26-27 °C y una altitud entre 50 y 55 metros sobre el nivel del mar (msnm). La zona de producción más importante de fruta para el mercado de exportación es Teapa. El área bananera más importante de Veracruz se localiza en San Rafael y Nautla, en la cual se presenta una precipitación anual de 1,743 mm, temperatura media de 24-25 °C y altitud de 20 a 80 msnm. Cerca de los límites con Veracruz se encuentra la zona de Tuxtepec, en el estado de Oaxaca, la cual produce principalmente plátano Macho (AAB) y Enano Gigante (AAA) (Orozco-Santos, 1998).

Región Pacífico Centro. La región comprende los estados de Colima, Michoacán, Jalisco y Nayarit; posee clima cálido seco con una precipitación de 700 a 1,100 mm anuales distribuidos en los meses de Junio a Octubre y el resto del año (7 a 8 meses) es seco. La temperatura media es de 26-28 °C y con una altitud de 10 a 60 msnm en todos los estados productores (Colima, Jalisco y Michoacán), con excepción del estado de Nayarit, en donde se cultivan plátanos desde 10 hasta 500 msnm. Alrededor del 60% de la superficie bananera de Colima, Jalisco y Michoacán se encuentra asociada con palma de coco (*Cocos nucifera* L.). Casi toda la producción de bananos es destinada al mercado nacional (Orozco-Santos, 1998).

Región Pacífico Sur. En esta región se ubica solo el estado de Chiapas y registra un clima cálido subhúmedo con 4 a 5 meses secos, precipitación anual de 1,500 a 2,500 mm, temperatura media de 26-27 °C y una altitud de 20 a 80 msnm. La zona bananera más importante se ubica en la costa del estado de Chiapas en el área conocida como el Soconusco. La producción se destina al mercado de exportación y nacional (Orozco-Santos, 1998).

1.4. Problemas fitosanitarios en las plantaciones bananeras

Las plantaciones bananeras son afectadas por diversas enfermedades que influyen en su producción, así como la calidad del fruto. En México las enfermedades más importantes son la Sigatoka negra (*M. fijiensis*), el nematodo barrenador (*Radopholus similis*), moko del plátano (*Ralstonia solanacearum*), pudrición del cormo (*Erwinia* sp.) y la mancha café

CAPÍTULO I

(*Cordana musae*) (Orozco-Santos, 1998). Existen otras enfermedades que representan una amenaza potencial para la producción de musáceas en México en caso de ser introducidas. Entre las más importantes se encuentran el mal de Panamá causado por la raza 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, el virus del bunchy top y el virus del mosaico de las brácteas. En la actualidad la mayoría de estas enfermedades solo se encuentran en Asia, África y Oceanía (Ploetz *et al.*, 1994).

En México, el principal problema fitosanitario que afecta la producción, es la enfermedad de la Sigatoka negra, también conocida como raya negra de la hoja, causada por *M. fijiensis*, un hongo Ascomiceto, hemibiotrófico, reconocido como la forma más agresiva del complejo de patógenos que causa las manchas foliares en banano (Stierle *et al.*, 1991).

1.5 *Mycosphaerella fijiensis*

Es un hongo verdadero de la clase Ascomycetes, haploide, filamentoso, y se ha demostrado que es el agente causal de la Sigatoka negra, el principal problema fitopatológico del cultivo del banano en América, Asia y África (Gauhl *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2012).

La clasificación taxonómica de *M. fijiensis* es la abajo descrita (Schoch *et al.*, 2006):

Reino:	Hongos
División:	Ascomycota
Clase:	Ascomycetes
Orden:	Dothideales
Familia:	Dothideaceae
Género:	<i>Mycosphaerella</i>
Especie:	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> , Morelet

M. fijiensis (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*) causa la enfermedad de la Sigatoka negra en bananos y plátanos (*Musa* sp). Es considerado el hongo más destructivo del complejo presente en la enfermedad de la Sigatoka negra y que incluye a *Mycosphaerella musicola* (anamorfo *P. musae*), agente causal de la enfermedad de la Sigatoka amarilla y *Mycosphaerella eumusae* (anamorfo *P. eumusae*) el cual causa la enfermedad de la mancha foliar. *Musa* sp. es el principal hospedero de *M. fijiensis*, y exhibe un rango de síntomas que dependen de sus niveles de tolerancia al patógeno. La planta *Heliconia psittacorum* fue descrita recientemente como un hospedero alternativo de *M. fijiensis* (Gasparotto *et al.*, 2005).

Este patógeno genera el mayor impacto económico, debido a que reduce la capacidad fotosintética impidiendo que la planta alcance la floración con un buen desarrollo vegetativo y el número adecuado de hojas funcionales que permita el llenado de los frutos en forma óptima; como resultado de dichos desórdenes las plantas producen racimos con peso por debajo de los estándares de comercialización (Guzmán, 2006).

La producción de banano en las zonas áridas y altas son menos favorables para el desarrollo de la enfermedad de la Sigatoka negra, aunque esta ventaja puede perderse por la capacidad de adaptación del patógeno a dichas zonas; en un estudio reciente se describió que en las partes altas de Costa Rica, *M. fijiensis* ha desplazado a *M. musicola*, patógeno que en general crece en temperaturas frías (Arzanlou *et al.*, 2007). Dicho hallazgo demuestra que *M. fijiensis* es una seria amenaza para todas las áreas de cultivo de banano de los países tropicales y subtropicales.

La enfermedad Sigatoka negra afecta a los cultivares de banano de postre (genomas AAA) y a los plátanos (genomas AAB). Las grandes extensiones de monocultivo de banano de exportación son del subgrupo Cavendish, especialmente del cultivar 'Gran Enano', altamente susceptible a la Sigatoka negra (Churchill, 2010). La virulencia de este patógeno se magnifica en un sistema agrícola como el de las musáceas, en el cual se practica la propagación vegetativa (reproducción asexual) y el cultivo en grandes extensiones de un clon genéticamente uniforme, factor que lo hace altamente vulnerable a ataques epidémicos de la enfermedad (Clay y Kover, 1996).

1.5.1 Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis*

M. fijiensis es un organismo heterotálico con ciclos de reproducción sexual (teleomorfo) y asexual (anamorfo). El término heterotálico se refiere a una especie constituida por individuos autoincompatibles, que para la reproducción sexual requieren la unión de gametos compatibles, sin considerar la presencia de ambos órganos reproductores, masculinos y femeninos, en el mismo individuo. Pero, puede también referirse a una especie en la cual los sexos se presentan en talos separados, de modo que para efectuar la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes, como es el caso de *M. fijiensis* (Meredith y Lawrence, 1969).

La reproducción sexual genera ascosporas, las cuales son diseminadas por el viento a largas distancias; esta fase es considerada como la más importante en la propagación de la enfermedad (Conde, 2007). Se da por compatibilidad o tipo de "sexo" mating (acoplamiento). Solo líneas de "mating" opuestos son capaces de cruzarse y producir ascosporas. La recombinación heterotálica crea un alto potencial para que ocurran cambios genéticos dentro de las poblaciones de *M. fijiensis*, lo que puede conducir a una rápida adaptación a las condiciones ambientales (Conde, 2007).

El ciclo sexual comienza con la producción de un espermagonio en las lesiones foliares necróticas; esta estructura permite acercar a las hifas receptoras para la fusión nuclear y la formación de un peritecio (Ware *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2003). Los peritecios se forman en las manchas maduras con su centro hundido, en su estado maduro contienen numerosas ascas que contienen ocho ascosporas cada una. Bajo condiciones favorables las ascas pueden ser producidas dentro de 2 semanas después de los estadios primarios de infección, los cuales se muestran como pequeñas manchas en el envés de las hojas. Después de una lluvia, a los pocos minutos de humedad en la lámina foliar, las ascosporas se descargan del asca madura y se diseminan por la corriente de aire. La descarga de ascosporas puede continuar hasta por dos horas después de que la lámina foliar se ha humedecido (Chong y Rodríguez, 2007).

Reproducción asexual. Su producto son los conidióforos y pueden emerger directamente por el estoma de manera individual o en grupos, o bien pueden formarse a partir de células del estroma, son de color oscuro y son visibles fácilmente en el estadio 2 de la

enfermedad (Mülder y Stover, 1976). Los conidios se forman diariamente, indistintamente, durante periodos de alta humedad y épocas secas (Chong y Rodríguez, 2007). En *M. fijiensis* los conidios se forman en esporoforos conocidos como esporoquios, en la cavidad estomática de la parte inferior de las hojas. Los conidios pueden dispersarse con la ayuda del agua y del viento. Una vez en dispersión solo pueden sobrevivir hasta su germinación por pocas horas (Burt, 2003).

La alta tasa de variación genética está dada por la reproducción sexual en el hongo, siendo esta la forma dominante de la reproducción de *M. fijiensis* (Carlier *et al.*, 1996).

Debido a su abundancia y pequeño tamaño, las ascosporas son más importantes que los conidios al dispersar la enfermedad entre plantas y dentro de las plantaciones (Chong y Rodríguez, 2007).

Tras la germinación de las ascosporas o conidios antes de penetrar en la hoja a través de los estomas, el patógeno puede desarrollarse en la superficie foliar durante algún tiempo. En condiciones óptimas, *M. fijiensis* puede completar su ciclo, desde la germinación hasta la producción de esporas secundarias, en 21 días (Dollacker *et al.*, 2007).

Ambas fases de reproducción asexual y sexual pueden estar presentes en las hojas infectadas. Se cree que la utilización en diversos propósitos de hojas de banano infectadas fue el factor que diseminó la enfermedad de un continente a otro (Carlier *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 2012).

1.5.2 Infección y sintomatología

Una vez que el inóculo llega a su hospedero, sin importar la etapa del ciclo sexual del cual provenga, las esporas germinan y el hongo infecta las hojas por los estomas. Una vez que alcanza la madurez sexual, se reproduce y vuelve a infectar al siguiente hospedero. Las esporas usualmente germinan dos o tres horas después de su descarga en la superficie húmeda de una hoja y el tubo germinativo penetra en el estoma de la hoja a las 48-72 horas, requiriendo una lámina de agua en la superficie; la humedad de la hoja y del ambiente son factores críticos para su desarrollo (Marín *et al.*, 2003). La mayoría de las infecciones se establecen en las hojas más jóvenes (las tres primeras) y en la hoja cigarro (Meredith y Lawrence, 1969). El tiempo que transcurre entre la infección y la aparición del primer síntoma en la hoja (momento en el cual se observan rayas pardas de 1-2 mm de longitud en el envés de la hoja) es de alrededor de 10 a 14 días bajo un sistema de desarrollo ideal, lo que requiere una temperatura de entre 25-28 °C y humedad óptima (92-100%), tanto en la planta como en el ambiente (Meredith y Lawrence, 1969). Las rayas evolucionan más tarde a lesiones necrosadas con halos amarillos y centros grises claros. Las lesiones pueden llegar a juntarse y destruir grandes áreas de tejido foliar; si la planta está en fructificación ocurre entonces una maduración precoz del fruto y menores rendimientos.

De acuerdo a Meredith y Lawrence (1969) y Fouré (1985) se han identificado seis etapas de severidad de síntomas de la enfermedad, los síntomas se describen en la Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Características de los síntomas de la enfermedad de la Sigatoka negra.

Etapas	Descripción	Aspecto
1. 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 estadio 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 la venas laterales de la hoja	
3. Segundo estadio de estría	Alargamiento de las estrías hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2mm de ancho, las cuales toman una coloración marrón oscuro y son visibles en el envés como rayas amarillas.	
4. Primer estadio de mancha	Ensanchamiento de las estrías que se tornan de color marrón oscuro y son rodeadas por una zona amarilla pálida; puede considerarse el primer estado de mancha.	
5. Segundo estadio de mancha	Inicio del colapso del centro (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 estadio 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.	

1.6 Estrategias de control

La Sigatoka negra es controlada principalmente con la aplicación de fungicidas de tipo sistémico y de contacto que son alternados como parte de una estrategia para retrasar o manejar la resistencia a ciertos fungicidas; 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).

Los fungicidas de contacto se utilizan para prevenir la enfermedad y no penetran la hoja de banano. Se aplican generalmente cada semana, para proteger la hoja que va emergiendo. Este tipo de fungicida inhibe la germinación del hongo, son de múltiples sitios de acción y se cree que no inducen el desarrollo de cepas resistentes (Bellaire *et al.*, 2010). Los fungicidas de tipo sistémico penetran la hoja de banano, algunos solo tienen un transporte translaminar y otros pueden ser distribuidos en toda la planta, este tipo de fungicida tiene un efecto curativo (Bartlett *et al.*, 2002; Bellaire *et al.*, 2010). El efecto curativo es más pronunciado en las rayas jóvenes (estadios 1 y 2), menos pronunciado en las lesiones viejas (estadios 3 y 4) y sin ningún efecto en los estadios necróticos (estadios 5 y 6), aunque la esporulación podría ser temporalmente disminuida. El modo de acción de estos fungicidas es sobre un sólo blanco (sitio específicos), por lo que la aparición de cepas resistentes es un problema frecuente (Bellaire *et al.*, 2010).

En la actualidad, la enfermedad está presente en todas las regiones productoras de banano del mundo, incluyendo México (Orozco-Santos, 1998). Su control, aunque es deseable que sea integral, se basa principalmente en la aplicación de fungicidas; el 40% del costo de la producción del banano se asocia a la aplicación de compuestos destinados al control de *M. fijiensis*. Cada día se requiere un mayor número de aplicaciones y en mayores dosis debido a que el hongo ha desarrollado resistencia a los fungicidas empleados en su control. El potencial de adaptación de este hongo es consecuencia de sus características biológicas de alta tasa de recombinación genética durante la reproducción sexual, múltiples generaciones del patógeno en un solo ciclo reproductivo de banano, altos niveles de población y alta capacidad de dispersión (McDonald y Linde, 2002). Esto agrava el problema económico, además de que tiene un serio impacto en el ambiente (Orozco-Santos *et al.*, 2000; Polanco *et al.*, 2002) y también afecta la salud de

quienes trabajan en las plantaciones que son tratadas con dichos fungicidas.

1.7 Mecanismo de acción de los fungicidas

De acuerdo con el Fungicide Resistance Action Committee (FRAC, por sus siglas en inglés) las principales clases de fungicidas usados en 2008 para controlar la Sigatoka negra, fueron:

- Los Inhibidores Multisitio (MSI) como Propineb, Mancozeb o Clorotalonil y cuyo mecanismo de acción es a través de la interferencia de diversas funciones celulares.
- Los inhibidores de la desmetilación de intermediarios en la ruta de biosíntesis del ergosterol (DMIs, por sus siglas en inglés). En general inhiben la biosíntesis del ergosterol y hay dos clases. La clase I inhiben la enzima 14 α demetilasa; como los triazoles. Los inhibidores de la clase II, inhiben varias enzimas como las reductasas y las isomerasas (aminas); su mecanismo de acción ha sido relacionado a la inhibición de $\Delta 7$ - $\Delta 8$ isomerasa y la C₁₄ reductasa; como las morfolinas.
- Las anilino pirimidinas son inhibidores de la síntesis de aminoácidos que bloquean la síntesis de metionina, necesaria en las proteínas.
- Los inhibidores de la quinona (QoI), como las estrobilurinas, bloquean la respiración de los hongos en el sitio exterior al complejo mitocondrial III. Las estrobilurinas actúan inhibiendo la respiración mitocondrial del hongo por la unión al complejo citocromo bc1 (Complejo III) en el sitio Qo (Gisi *et al.*, 2002).
- Los benzimidazoles como el benomilo son ampliamente usados; la actividad antifúngica es conferido por su unión a la β -tubulina, una subunidad de la proteína tubulina y componente de los microtúbulos. La unión del fungicida a la β -tubulina evita el ensamblaje de los microtúbulos y se interrumpe la división celular del hongo.

El FRAC recomienda aplicar mezclas de fungicidas con diferentes modos de acción, no exceder el máximo en la cantidad total aplicada/año para cada modo específico de acción, considerar el uso rotatorio de fungicidas específicos con compuestos multisitio, no reducir las dosis de las sustancias en la mezcla (no servirán de mucho en el manejo de la resistencia si no son eficaces a la dosis empleada en la mezcla). Estas recomendaciones

son necesarias para minimizar el riesgo de desarrollar resistencia (FRAC, 2008).

1.8 Manejo de la Sigatoka negra en México

El impacto de la Sigatoka negra ha sido devastador en las regiones bananeras de México. Cuando ocurrió la primera epidemia de la enfermedad se presentaron pérdidas en la producción de fruta que oscilaron entre 50 a 100%, aunado a una marcada reducción en la superficie dedicada al cultivo de banano.

Hasta hace dos décadas (1990-1995), en México el control químico de la enfermedad se realizaba mediante el uso de fungicidas de acción sistémica del grupo de los triazoles (Tebuconazol, Propiconazol, Bitertanol, Fenbuconazole y Hexaconazol), benzimidazoles (Benomilo, Carbendazim y Metil tiofanato), morfolinás (tridemorf) y estrobilurinas (Azoxistrobin) (Orozco-Santos, 1998) y de fungicidas de contacto (Clorotalonil y Mancozeb). Sin embargo, a partir de 1995 hubo cambios notables en los programas de control al incrementarse el uso de fungicidas de contacto en todas las áreas productoras de México (Escudero y Rendón, 1996). A partir de esos programas se implementó la aplicación periódica (cada 7 a 14 días) con el propósito de proteger de la enfermedad cada hoja de banano que va emergiendo.

En México anualmente se gastan alrededor de 500 millones de pesos (43.5 millones de dólares) para el combate de la Sigatoka negra. En regiones productoras como Tabasco, en donde las condiciones climáticas (2,500 a 3,000 mm de precipitación anual) son favorables para el progreso de la enfermedad, se requieren cada año de 30 a 35 ciclos de aspersión de fungicidas de contacto-sistémico o bien de 40 a 52 ciclos con fungicidas de contacto. En el municipio de Teapa, principal zona productora de banano en Tabasco utilizan principalmente los fungicidas de contacto Mancozeb, Zineb y Maneb (derivados del etilenbisditiocarbamato); la aplicación se realiza por aspersión aérea. Cincuenta y dos ciclos de aspersión son aplicados al año, usando 2.5 kg/ha del producto por semana o aproximadamente 130 kg/ha al año (Melgar *et al.*, 2008). En cambio, en la región del Pacífico Centro se utilizan de 15 a 20 aplicaciones en los programas de fungicidas sistémicos-~~contactos~~, o de 30 a 35 ciclos con los programas de solo de contacto (Orozco-Santos, 1998).

La tendencia actual de los programas de control basados en fungicidas de contacto ha permitido reducir significativamente el uso de citrolina o aceite agrícola. Sin embargo, la cantidad aplicada de ingrediente activo de fungicidas por unidad de superficie se ha incrementado, debido a las dosis más altas y al mayor número de ciclos de aspersion, por lo que se calcula que más de 2.5 millones de kilogramos de ingrediente activo de fungicidas protectantes (de contacto) son depositados anualmente a escala nacional (Orozco-Santos, 1998; Melgar *et al.*, 2008).

1.9 Resistencia de *M. fijiensis* a los fungicidas

En la última década se ha detectado pérdida de sensibilidad del hongo a los fungicidas sistémicos del grupo de los benzimidazoles, incluso se ha demostrado que la resistencia a benomilo persiste por periodos de 3 a 5 años después de que cesan las aplicaciones (Orozco-Santos *et al.*, 2001). Se ha reportado la pérdida de sensibilidad de *M. fijiensis* al fungicida propiconazol (fungicida sistémico) cuando se aplica junto con benomilo (Fullerton y Tracey, 1984; Romero y Sutton, 1998).

La resistencia de *M. fijiensis* al grupo químico de las estrobilurinas es conferido por la sustitución del aminoácido glicina por alanina en la posición 143; esta mutación se denomina G143A (Sierotzki *et al.*, 2000). La resistencia a los DMIs (*e.g.* propiconazol) está correlacionada con la ocurrencia de una de las siguientes siete mutaciones puntuales (Y136F, A313G, Y461D, Y463D, Y463H, Y463N y Y463S) en la secuencia del gen CYP51 que codifica a la enzima esterol 14 α desmetilasa una enzima esencial en la vía de biosíntesis del ergosterol (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009; Chong *et al.*, 2010). La mutación de este gen se ha descrito en otros hongos incluyendo al patógeno del trigo *Mycosphaerella graminicola*, el cual adquiere resistencia a los fungicidas de tipo azol (Bean *et al.*, 2009).

Los benzimidazoles, como el benomilo, son fungicidas sistémicos que son ampliamente usados desde los años 70s para controlar la enfermedad de la Sigatoka negra. La resistencia de *M. fijiensis* a dicho fungicida fue reportada por primera vez en Honduras en 1977 después de dos o tres años de uso continuo. Sin embargo, este fungicida continuó usándose en todos los países de América Central y México y posteriores estudios evidenciaron los problemas de resistencia en diversas áreas bananeras (Fullerton y

Tracey, 1984; Stover, 1980). La resistencia se debe a un cambio del nucleótido citosina a adenina en el codón 198 del gen de la β -tubulina de *M.fijiensis* (Cañas-Gutiérrez, 2006).

1.10 Estrategias para determinar la biomasa de fitopatógenos

En los estudios de interacción planta-hongo para evaluar adecuadamente la patogenicidad del hongo y la resistencia del hospedero a menudo se requiere una rápida y precisa medición del crecimiento del hongo en la planta. Existen varios métodos para detectar y cuantificar a los hongos fitopatógenos, por ejemplo estimar la biomasa midiendo los niveles de constituyentes del hongo como son el ergosterol o la quitina (Martin *et al.*, 1990); sin embargo, este método carece de especificidad y no siempre correlaciona con la biomasa del hongo (Benito *et al.*, 1998). Otro método consiste en realizar análisis inmunológicos; sin embargo, este método requiere de anticuerpos específicos para los hongos particulares y los anticuerpos son difíciles de obtener (Ward *et al.*, 1998).

Un método establecido y comúnmente empleado para el monitoreo de la resistencia de *M.fijiensis* a ciertos fungicidas está basado en la medición de la germinación de ascosporas en cajas de petri con agar-agua, suplementado con diferentes concentraciones de fungicidas (Smith *et al.*, 1991). Aunque este método es fácil, se requiere de mucho tiempo; es inexacto, y se requiere de experiencia y habilidad para el conteo y la medición de la germinación de ascosporas.

En años recientes, la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de punto final emergió como una herramienta importante para el diagnóstico y detección de hongos fitopatógenos, y ha contribuido grandemente al diagnóstico temprano de las enfermedades de plantas (Johanson y Jeger, 1993); sin embargo, un problema que presenta esta técnica es que la amplificación no es consistente durante todos los ciclos de la reacción de PCR, y por ello sigue siendo poco fiable para el análisis cuantitativo (Hietala *et al.*, 2003).

La técnica de PCR en tiempo real emergió a mediados de los 90s como un nuevo método para la detección y cuantificación específica de templados de ADN y ARN (Heid *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996). Con el paso del tiempo ha demostrado ser confiable para

cuantificar microorganismos como bacterias y hongos (Hierro *et al.*, 2006).

A diferencia de la PCR de punto final, la PCR en tiempo real permite monitorear en cada ciclo la acumulación de amplicones, mediante el uso de fluoróforos que se intercalan en el ADN de reciente amplificación (Hietala *et al.*, 2003). Tiene grandes ventajas pues con el proceso de monitoreo de la acumulación del fluoróforo permite una rápida medición de los niveles de carga del patógeno en el tejido hospedero y con ello ahorra tiempo de implementación en ensayos visuales; además, esta técnica permite cuantificar ADN incluso a muy bajas concentraciones (picogramos por microlitro; Valsesia *et al.*, 2005).

1.11 Características y aplicación de la PCR en tiempo real

La reacción de PCR en tiempo real se lleva a cabo en un termociclador que permite la medición directa de una molécula fluorescente que se incorpora de manera específica al ADN recién sintetizado, dicha característica elimina los pasos posteriores a la amplificación del ADN y que en contraparte, en la PCR de punto final se requieren para observar los productos de la amplificación. La eliminación de dichos pasos en la PCR en tiempo real minimiza el error experimental. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que se requiere amplificar. Los métodos utilizados para la amplificación son los específicos de secuencia (TaqMan) y los de secuencia no específica (Heid *et al.*, 1996).

- Método de amplificación de secuencia no específica: Es un método de detección en el que se utiliza un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se intercala en el ADN de doble cadena; el más utilizado es el SYBR Green I (Morrison *et al.*, 1998). El fluoróforo en solución exhibe poca fluorescencia, pero su fluorescencia incrementa cuando se une al ADN de doble cadena. Por lo tanto la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN de doble cadena presente en la muestra en estudio (Heid *et al.*, 1996).
- Método de amplificación de secuencia específica: Se utiliza una sonda que lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del

CAPÍTULO I

"quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. La sonda TaqMan es ampliamente utilizada para identificar diferentes hongos y oomicetos patógenos de plantas (Vandemark y Grunwald, 2005).

La utilidad de la técnica de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de diversos fitopatógenos ha sido documentada en múltiples estudios. Shishido *et al.* (2009) describieron la detección y cuantificación de *Phomopsis sclerotioides*, en plantas y en suelo; Huang *et al.* (2010) reportaron la detección de *Phytophthora nicotianae* en suelos infestados naturalmente.

Esta técnica también se ha utilizado para determinar la biomasa de *Magnaporthe grisea* en plantas de arroz (Qi y Yang, 2002); en dicho estudio la determinación de la biomasa del hongo se realizó utilizando curvas estándar de ADN, el cual se recuperó de diferentes cantidades de biomasa del hongo. Una estrategia similar se implementó para la detección de *Armillaria* en tejido vegetal (Baumgartner *et al.*, 2010). La técnica de PCR en tiempo real permite analizar un gran número de muestras, además puede ser aplicada para evaluar la resistencia de la planta a ciertos patógenos o eficacia de fungicidas mediante la cuantificación de la biomasa del patógeno presente en el hospedero (Valesia *et al.*, 2005). En el presente trabajo la estrategia de cuantificación de la biomasa de *M. fijiensis* en las hojas de banano fue implementada siguiendo las directrices de los trabajos arriba descritos y con dicha técnica se evaluó la eficacia de los fungicidas utilizados para el control de la Sigatoka negra en las plantaciones de banano de Teapa, Tabasco.

OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante PCR en tiempo real como la aplicación intensiva y semi intensiva de fungicidas sistémicos y de contacto, inciden en la cantidad de inóculo de *Mycosphaerella fijiensis* en plantaciones de banano ubicadas en el municipio de Teapa, Tabasco.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Colectar hojas de banano que muestren síntomas de Sigatoka negra en plantaciones del municipio de Teapa Tabasco y que se manejen con aplicaciones semi intensivas e intensivas de fungicidas y en una zona rural sin aplicación de fungicida.
2. Extraer ADNg de las hojas de banano colectadas en las plantaciones de Teapa con manejo semi-intensivo e intensivo de fungicidas y en la zona rural
3. Amplificar por PCR de tiempo real al gen de la β -tubulina de *Mycosphaerella fijiensis* a partir del ADNg obtenido de hojas de banano enfermas de Sigatoka negra y colectadas en plantaciones con manejo semi-intensivo e intensivo de fungicidas y en la zona rural
4. Cuantificar la biomasa de *Mycosphaerella fijiensis* presente en hojas de banano colectadas a partir de plantaciones de Teapa con manejo semi intensivo e intensivo de fungicidas y en la zona rural.

JUSTIFICACIÓN

La Sigatoka negra ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es una de las enfermedades más devastadoras que afecta las plantaciones de banano a nivel mundial. En ausencia de medidas de control de la enfermedad está puede reducir hasta en un 50% el peso del racimo y causar pérdidas del 100% de la producción debido al deterioro en la calidad (longitud y grosor del fruto) (Rodríguez-Gaviria y Cayón, 2008). En la actualidad dicha enfermedad es controlada principalmente mediante la aplicación alternada y en mezcla de fungicidas de contacto y sistémicos.

En algunas plantaciones ubicadas en el municipio de Teapa, Tabasco; la aplicación de los fungicidas está influenciada por la experiencia de los trabajadores o los productores quienes deciden el tipo, y la frecuencia de las aplicaciones del fungicida sin seguir un programa que establezca el uso adecuado de los mismos. En dichas plantaciones el control de la Sigatoka negra está basado principalmente en la aplicación semi intensiva (fungicida de contacto) e intensiva de fungicida (de contacto y sistémico) y en la realización de prácticas culturales como son el deshoje y el deshije.

El número de aplicaciones de fungicidas es un factor determinante para mantener bajo control el inóculo de *M. fijiensis* y por ende la sanidad de las plantaciones de banano. Por ello es necesario realizar un manejo racional de los fungicidas, ya que estos son nocivos para el ambiente y para la salud de los trabajadores que se encuentran en dichas plantaciones; por otra parte el uso inadecuado de los fungicidas ocasiona que el patógeno se vuelva resistente y se dificulte el manejo de la enfermedad que produce.

Con el objetivo de analizar el efecto de la aplicación de fungicidas sobre el inóculo de *M. fijiensis* en plantaciones de banano que se mantienen con manejo semi intensivo, intensivo de fungicida y en una zona rural sin aplicación de fungicida en el municipio de Teapa, Tabasco, en este trabajo se determinó por PCR en tiempo real la cantidad de biomasa de *M. fijiensis* que se mantiene en las plantaciones, antes, durante y después de la aplicación de los agentes químicos. Se espera que a partir de los resultados obtenidos se puedan hacer propuestas para el establecimiento de normas y programas que resulten en una mejor orientación a los productores en cuanto al uso correcto del número y frecuencia en la aplicación de fungicidas, y con ello reducir el uso de esta clase de

compuestos. Se pretende además que la metodología se transfiera a un centro de control y diagnóstico designado. Así mismo, al ser este trabajo una pequeña sección de un programa más amplio, este estudio también fomentará la concientización de los productores de banano acerca de la importancia de emplear prácticas culturales para el control integral de la Sigatoka negra.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo los objetivos planteados, se colectaron segmentos de hojas de banano provenientes de plantaciones de banano mantenidas con régimen semi intensivo e intensivo de fungicida, y en una zona rural sin aplicación del fungicida. Para propósito de este estudio la Plantación de Manejo semi intensivo se define como aquella que recibe como máximo 52 aplicaciones al año de fungicida de contacto. La Plantación de Manejo intensivo se define como aquella que recibe hasta 46 aplicaciones de fungicida de contacto y más de 4 aplicaciones de fungicida sistémico al año. Al igual se realizó la colecta en una zona rural, sitio donde existen plantas de banano que no han sido expuestas a ningún tipo de fungicida y que por sus características (número de plantas de banano, área cultivada y forma de manejo) es una zona diferente a la de las plantaciones comerciales de banano.

La estrategia experimental que se empleó (Figura 1.1) consistió en colectar segmentos de hojas de banano antes, durante y después de la aplicación del fungicida en las dos plantaciones seleccionadas así como de la zona rural. A partir de dichos materiales se extrajo el ADNg y se cuantificó por PCR en tiempo real la biomasa de *M. fijiensis* en las muestras colectadas en las plantaciones con diferente régimen de aplicación de fungicida.

CAPÍTULO I

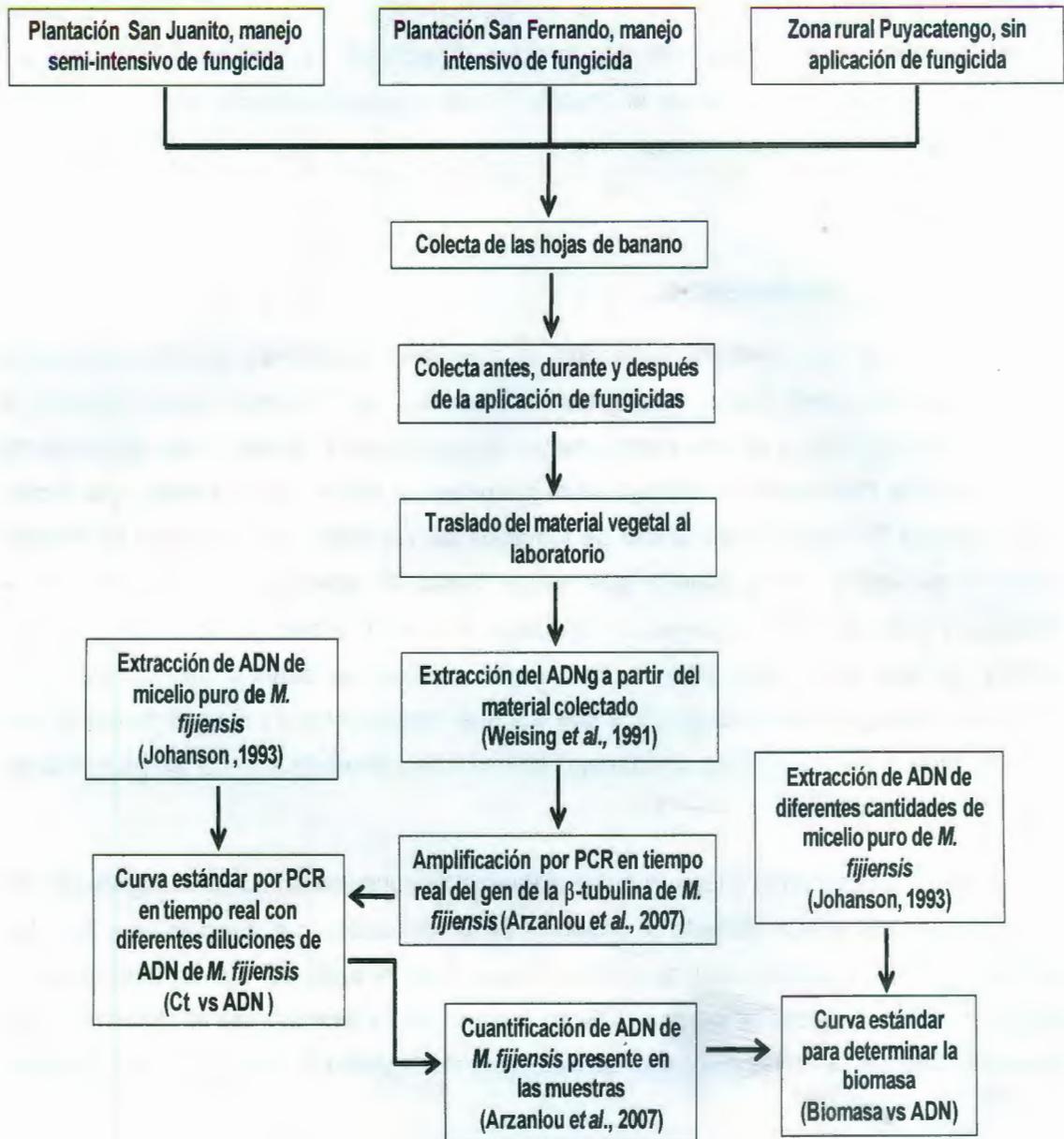


Figura 1.1 Diagrama de la estrategia experimental utilizada en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anonymous. (2008). Meeting Minutes of the Banana Working Group of the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). [http:// www.frac.info/frac/index.htm](http://www.frac.info/frac/index.htm) (consultado diciembre 2011).
- Arzanlou M., Waalwijk C., Guzmán M., W. Crous P., Carlier J. (2007). Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*, 97: 1112-1118.
- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. (2002). Review: the strobilurin fungicides, *Pest Management Science* 58: 649–662.
- Baumgartner K., Bhat R., Fujiyoshi P. (2010). A rapid infection assay for *Armillaria* and real-time PCR quantitation of the fungal biomass in planta. *Fungal Biology*, 114: 107-119.
- Bean T.P., Cools H.J., Lucas J.A., Hawkins N.D., Ward J.L., Shaw M.W., Fraaije B.A. (2009). Sterol content analysis suggests altered eburicol 14a-demethylase (CYP51) activity in isolates of *Mycosphaerella graminicola* adapted to azole fungicides. *FEMS Microbiol. Lett*, 296: 266–273.
- Bellaire Luc de Lapeyre, Fouré E.; Abadie C., Carlier J. (2010). Black leaf streak disease is challenging the banana industry. *EDP Sciences*, 65(6): 327-342.
- Benito E. P., Ten Have A., Van Klooster J. W., Van Kan J. (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *European Journal Plant Pathology*, 104: 207-220.
- Bompard J. M., Sharrock S. (2000). Banana a basic food. *Bananas*. IPGRI/INIBAP/CIRAD. Paris, Francia. 6-7
- Burt P. Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*. (2003). 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San José (CRI), 20-23.
- Cañas-Gutiérrez G. P., Angarita-Velásquez M. J., Restrepo-Flórez J. M., Rodríguez P., Moreno C. X., Arango R. (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded

CAPÍTULO I

- protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. Pest Management Science 65: 892–899.
- Cañas-Gutiérrez G. P., Patiño L. F., Rodríguez–Arango E., Arango R. (2006). Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. Journal of Phytopathology, 154: 403–409.
- Carlier J., Lebrun M. H., Zapater M. F., Dubois C., Mourichon X. (1996). Genetic structure of the global population of bananas black leaf streak fungus *Mycosphaerella fijiensis*. Molecular Ecology, 5: 499-510.
- Chong P., Arango R., Stergiopoulos I., Guzmán M., Crous P. W., Silva G. F., De Wit P., Kema G. (2010). Analysis of azole fungicide resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka. Proceedings of the 16th International Reinhardtsbrunn Symposium 2010. Modern Fungicides and Antifungal Compounds, Friedrichroda, Germany, VI (in press).
- Chong P and Rodríguez H. (2007). Diversidad genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet provenientes de haciendas bananeras con manejo orgánico y convencional. Revista Tecnológica ESPOL, 20 (1): 215-222.
- Churchill A. (2010). Pathogen profile. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. Molecular Plant Pathology, 1364-3703.
- Clay K. and Kover P. (1996). Evolution and stasis in plant pathogen associations. Ecology, 77: 997-1003.
- Conde L. (2007). El locus *MAT* (*mating-type*) de los ascomicetos: su evolución, estructura y regulación. Revista Iberoamericana de Micología, 24: 95-99.
- Dollacker A., Doughty K., Hass M. (2007). Protección de un tesoro tropical: el banano. Bayer CropScience, 1-32.

Escudero M. C., Rendón E. C. (1996). Integrated management experiences with black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) and non-systemic fungicides in Soconusco, Chiapas, Mexico. XII Meeting ACORBAT. Santo Domingo, República Dominicana (Abstract), 53.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. (2010). Bananos. <http://faostat.fao.org/>. (consultado en agosto 2011).

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, 23.

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.

Gasparotto L., Pereira J., Urben A., Hanada R., Pereira M. (2005). *Heliconia psittacorum*: hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da Sigatoka-negra da bananeira. Fitopatol. Bras, 30(4): 423-425.

Gauhl F., Pasberg-Gauhl C., Jones D. (2000). Black leaf streak. Disease cycle and epidemiology. In: Disease of Bananas, Abaca and Enset (ed. Jones DR), 56-62.

Gibson U., Heid C., Williams P. (1996). A novel method for real-time quantitative RT-PCR. Genome Research, 6: 995-1001.

Gisi U., Sierotzki H., Cook A., McCaffery A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. Pest Management Science, 58: 859-867.

Guzmán M. (2006). Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil, 83-91.

Heid C., Stevens J., Livak K., Williams P. (1996). Real Time Quantitative PCR. Genome Research, 6: 986-994.

CAPÍTULO I

- Hierro N., Esteve-Zarzoso B., González A., Mas A., Guillamón J. (2006). Real-time quantitative (QPCR) and reverse transcription–QPCR for detection and enumeration of total yeast in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7148-7155.
- Hietala A., Eikenes M., Kvaalen H., Solheim H., Fossdal C. (2003). Multiplex real-time PCR for monitoring *Heterobasidion annosum* colonization in Norway spruce clones that differ in disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4413-4420.
- Huang J., Wu J., Wang G. (2010). Detection of *Phytophthora nicotianae* in soil with Real-Time Quantitative PCR. *Journal of Phytopathology*, 158: 15-21.
- Johanson A. y Jeger J. (1993). Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spot in banana and plantain. *Mycological Research*, 97(6): 670-674.
- Marín D., Romero R., Guzmán M., Sutton T. (2003). Black sigatoka: An increasing treat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87: 208-222.
- Martin F., Delaruelle A., Hilbert J. (1990). An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycological Research*, 94:1059-1064.
- McDonald B., Linde C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 349–379.
- Melgar C., Geissen V., Cram S., Sokolov M., Bastidas P., Ruiz L., Que Ramos F., Jarquín A. (2008). Pollutants in drainage channels following long-term application of Mancozeb to banana plantations in southeastern Mexico. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171: 597-604.
- Meredith D., Lawrence J. (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.

-
- Morrison T., Weis J., Wittwer C. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, 24(6): 954–962.
- Mülder J., Stover R. (1976). *Mycosphaerella* species causing banana leaf spot. *Transactions of the British Mycological Society*, 67: 77-82.
- Novak F. (1992). *Musa* (bananas and plantains) In: Hammerschlag FA, Litz R. *Biotechnology of Perennial Fruits Crops*. CABI Publ, Wallingford, UK. 18: 449-488.
- Orozco-Santos M., Farías-Larios J., Manzo-Sánchez G., Guzmán-González S. (2000). Black Sigatoka in Mexico. *INFOMUSA*, 10: 33-37.
- Orozco-Santos M. (1998). Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Folleto técnico No. 1. 95.
- Orozco-Santos M. and Orozco-Romero J. (2004). La Sigatoka negra en bananas y plátanos: el caso de México. XVI Reunión Internacional ACORBAT. Oaxaca, México. Septiembre 2004, 70-78.
- Orozco-Romero J., Ramírez Sandoval G., Vázquez Valdivia V. (2006). Comportamiento del banano FHIA-01 y plátano FHIA-21 en México. *Memorias del Simposium Internacional sobre Sigatoka negra*. SAGAR, INIFAP, INIBAP, 112-121.
- Ploetz R. C., Zentmeyer G. A., Nishijima W. T., Rohrbach K. G. and Ohr H. D. (1994). *Compendium of tropical fruit diseases*. American Phytopathological Societys, St. Paul, Minesota, USA, 88.
- Polanco T., Carlier J., Zapater M. (2002). Diagnóstico, Distribución y aislamiento de *Mycosphaerella* presentes en musaceas de República Dominicana. *Centro Agronómico Tropical y Enseñanza. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 64: 62-66.

CAPÍTULO I

- Qi M. and Yang Y. (2002). Quantification of *Magnaporthe grisea* during infection of rice plants using real-time polymerase chain reaction and northern blot/phosphoimaging analyses. *Phytopathology*, 92: 870-876.
- Robert S., Ravigne V., Zapater M-F., Abadie C. and Carlier J. (2012). Contrasting introduction scenarios among continents in the worldwide invasion of the banana fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 21: 1098-1114
- Rodríguez Gaviria, A., Cayón G. (2008). Efecto de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la fisiología de la hoja de banano. *Agronomía Colombiana*, 26(2): 256-265.
- Romero R. and Sutton T. (1998). Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Disease*, 82: 931-934.
- Schoch L., Shoemaker A., Seifert A., Hambleton S., Spatafora W., Crous W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using for nuclear loci. *Mycologia*, 98(6): 1041-1052.
- Shishido M., Sato K., Yoshida N. (2009). PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotoides* in plants and soil. *The Phytopathological Society of Japan and Springer*, 76: 21-30.
- Sierotzki H., Parisi S., Steinfeld U., Tenzer I., Poirey S., Gisi U. (2000). Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome *bc1* enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science*, 56: 833-841.
- Simmonds W. and Shepherd K. (1955). Taxonomy and origin of cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London Botany*, 55: 302-312.
- Simmonds W. (1962). *The Evolution of Bananas*. Tropical Agricultures Series, 149-148.
- Smith H., Trivellas E., Johnson E., Joshle M. (1991). Methods for monitoring the sensitivity of a range of fungal pathogens to benzimidazole fungicides. *Bulletin OEPP*, 21: 336-341.

-
- Souza C., Silva C., Ferreira A. (2003). Sex in fungi: lessons of gene regulation. *Genetic Molecular Research*, 2 (1): 136-147.
- Stierle A., Upadhyay R., Hershenhorn J., Strobel A., Molina G. (1991). The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia*, 47: 853-858.
- Stover H. (1980). Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. *Plant Dis*, 64: 750–756.
- Stover H., Simmonds W. (1987). Bananas. Tropical Agriculture Series. Longman, Harlow, 19: 465-468.
- Valsesia G., Gobbin D., Patocchi A., Vecchione A., Pertot I., Gessler C. (2005) Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 95: 672-678.
- Vandemark G. and Grunwald J. (2005). Use of real-time PCR to examine the relationship between disease severity in pea and *Aphanomyces euteiches* DNA content in roots. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 309-316.
- Ward E., Tahiri-Alaoui A., Antoniw F. (1998). Application of PCR in fungal–plant interactions. Pages 289-307 in: *Application of PCR in Mycology*. P. D. Bridge, D. K. Arora, C. A. Reddy, and R. P. Elander, eds. CAB International, London, UK.
- Ware S., Díaz C., Kema G., Van der Lee T., De Waardm. (2006). Aspects of sexual reproduction in *Mycosphaerella* species on wheat and barley: genetic studies on specificity, mapping, and fungicide resistance. PhD thesis Wageningen University, The Netherlands, ISBN 90-8504-527-4 Chapter 2: 34, Chapter 5: 102 – 104; 114 – 119.

CAPÍTULO II

CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DE *Mycosphaerella fijiensis* POR PCR EN TIEMPO REAL, EN HOJAS DE BANANO COLECTADAS EN PLANTACIONES DE TEAPA, TABASCO CON DIFERENTE MANEJO DE FUNGICIDAS.

2.1 INTRODUCCIÓN

En México, el banano es un cultivo de gran importancia económica y social, por la generación de empleo en miles de jornales al año; ocupa el segundo lugar de los frutales tropicales que se cultivan comercialmente. Chiapas y Tabasco son los estados que abastecen con mayor porcentaje el mercado nacional e internacional (Cabrera, 2004).

En el estado de Tabasco el cultivo de banano constituye una de las principales actividades agrícolas; siendo el municipio de Teapa el principal productor de banano, con una superficie cultivada de 6,384.50 hectáreas y una producción anual de 332,387.10 toneladas de fruta (SAGARPA, 2010). En esta región se cultiva principalmente la variedad Enano Gigante; desafortunadamente el problema fitosanitario más importante para esta variedad es la enfermedad de la Sigatoka negra, ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

El control químico es la principal herramienta para el manejo del agente causal de la Sigatoka negra, mediante la aplicación de fungicidas de contacto y sistémicos (Orozco, 1998). Con la finalidad de determinar como la aplicación de fungicidas repercute sobre la cantidad de biomasa de *M. fijiensis* en plantaciones con diferente régimen de aplicación de fungicida, se identificaron dos plantaciones en el municipio de Teapa, con diferente tipo de manejo de fungicidas; las plantaciones fueron seleccionadas de acuerdo al número de aplicaciones y al tipo de fungicida que se les aplica. De acuerdo a esto, en la plantación donde aplicaban consecutivamente fungicida de contacto (aplicación semanal) fue clasificada como de manejo semi intensivo; la plantación donde realizaban aplicaciones alternadas de fungicidas sistémicos y de contacto (cada 7 días fungicida de contacto y más de 4 aplicaciones al año de fungicida sistémico) se clasificó como de manejo intensivo. En las plantaciones seleccionadas se colectaron segmentos de hojas enfermas de Sigatoka negra y posteriormente fueron analizadas por la técnica de PCR en tiempo

real con el fin de determinar cómo la aplicación de fungicidas afecta la cantidad de inóculo de *M. fijiensis*. También se colectaron muestras de hojas de banano en la localidad de Puyacatengo, Tabasco, un área que no recibe aplicación de fungicida; dichas muestras fueron utilizadas como control.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Colecta del material vegetal en Teapa, Tabasco

El material vegetal se colectó en julio de 2010, en la época descrita como de alta precipitación pluvial; sin embargo, durante el tiempo del muestreo la precipitación fue de solo 2.9 mm, la colecta fue realizada en plantaciones de banano ubicadas en el municipio de Teapa, Tabasco, que se manejan con aplicación intensiva y semi intensiva de fungicida y una zona sin aplicación de fungicida. En cada plantación se delimitaron cinco cuadrantes (Figura 2.1). De cada área se colectaron segmentos de hojas enfermas con Sigatoka negra.

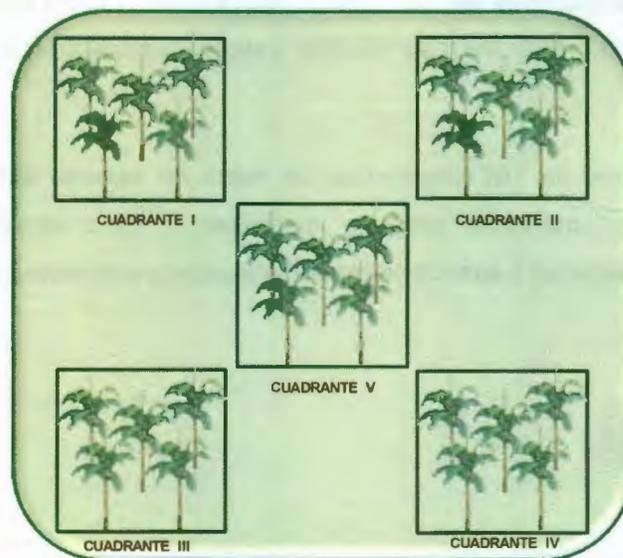


Figura 2.1 Diseño de las áreas de colecta del material vegetal en las plantaciones de Teapa, Tabasco.

CAPÍTULO II

La plantación denominada como de manejo semi intensivo fue la empacadora San Juanito "Bronco Bananas", con una altitud de 10.36 msnm, N: 17°40.811', WO: 92°57.053', localizada en la carretera Federal 195 entre Teapa y Villahermosa (Figura 2.2); en ella se aplicó el fungicida de contacto Mancozeb, la aplicación por aspersión se realizó cada siete días, el material fue colectado antes, durante y después de la aplicación del fungicida.

La plantación de manejo intensivo fue la Finca San Fernando, a una altitud 27.43 msnm, N: 17°34.837', WO: 92°49.551' (Figura 2.2); en esta plantación se utilizó mezcla de fungicida sistémico Folicur, realizando aplicaciones del mismo cada tres semanas y el fungicida de contacto Mancozeb, el cual fue aplicado semanalmente; durante el muestreo dicha plantación ya había recibido ocho aplicaciones previas de fungicida sistémico, recibiendo un total de 15 aplicaciones durante el año.

También se colectaron muestras en una zona sin aplicación de fungicidas (plantas de manejo rural), en la localidad de San José Puyacatengo (Figura 2.2), con una altitud de 44.80 msnm, N: 17° 31. 652', WO: 92°55.789'; estas muestras fueron seleccionadas como control.

Se colectaron un total de 167 segmentos de hojas de banano enfermas con Sigatoka negra, los cuales se marcaron para su identificación. Una vez en el laboratorio las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso.

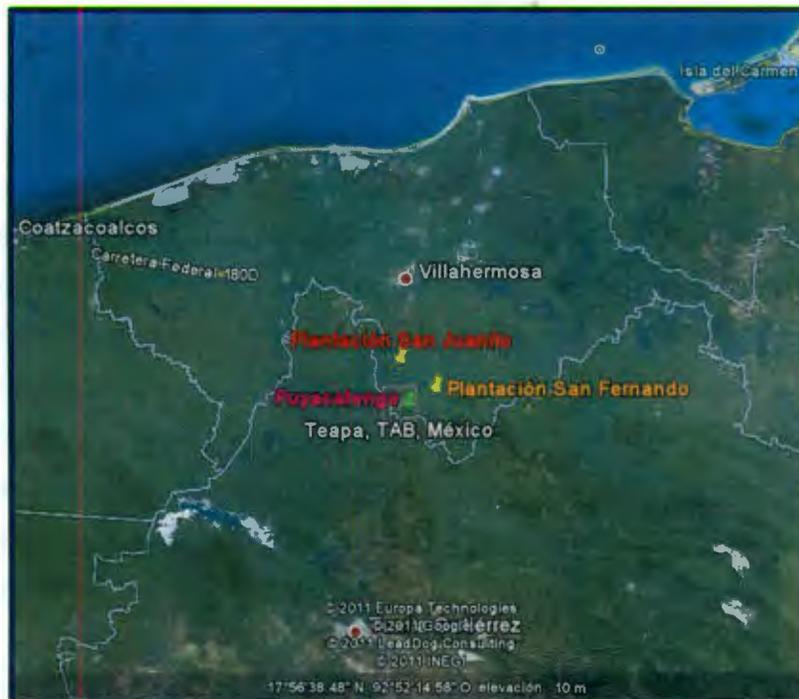


Figura 2.2 Ubicación geográfica de las localidades de muestreo. Plantaciones San Fernando, San Juanito y Puyacatengo.

2.2.2 Cultivo *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*

La propagación *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* se realizó mediante el protocolo descrito por Islas-Flores *et al.*, 2006. Micelio de la cepa C1233 (25 g) de 15 días de edad se colocó en un mortero y se adicionaron 10 mL de H₂O estéril. El micelio se desagregó macerando con el pistilo, se pipeteó una alícuota de 1 mL como inóculo y se vertió en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio líquido V8 fresco, adicionado con 0.2% de carbonato de calcio. Los matraces se incubaron en orbitador a 150 rpm a temperatura ambiente. Se realizó una resiembra cada 15 días.

2.2.3 Extracción del ADNg de *Mycosphaerella fijiensis*

A partir del micelio de la cepa C1233 de *M. fijiensis* cultivada *in vitro*, se realizó la extracción del ADNg siguiendo el protocolo descrito por Johanson (1993) con ligeras modificaciones. Brevemente, diferentes cantidades de micelio (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 y 200 mg) se maceraron en presencia de nitrógeno líquido, hasta que se obtuvo un polvo fino. El macerado se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL; se adicionó con 750 µl de la solución de extracción (200 mM Tris-HCl, pH: 8; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) y 2 µl de 14.3M de β-mercaptoetanol; los tubos se agitaron e incubaron a 65°C por 1 h. Concluido el tiempo de incubación se agregó 600 µl de fenol: cloroformo (1:1) y se centrifugó por 30 min a 13000 rpm; el sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf nuevos de 1.5 mL. A cada tubo se le añadió 600 µl de solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 10 min a 13000 rpm. El sobrenadante (fase acuosa) se transfirió a tubos Eppendorf nuevos y se les agregó 20 µl de Acetato de Sodio 3 M y 700 µl de etanol absoluto, se centrifugaron por 5 min a 13000 rpm. Se decantó el sobrenadante y la pastilla resultante se lavó con 400 µl de etanol al 70%, los tubos se centrifugaron por 5 min a 13000 rpm, el lavado se realizó por duplicado. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 20 min. La pastilla se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada estéril. El ADN obtenido a partir de las diferentes cantidades de micelio fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000) a 260/280 nm.

Con los datos obtenidos se realizó una curva estándar, como reportó Shishido Masahiro *et al.* (2009). Se graficó la cantidad de micelio contra la cantidad de ADNg extraído a partir de las diferentes cantidades de micelio de *M. fijiensis*. Dicha gráfica se utilizó para determinar la biomasa de *M. fijiensis* presente en las muestras de hoja colectadas en las plantaciones con diferente manejo de fungicidas.

2.2.4 Extracción del ADNg a partir de las hojas de banano colectadas en las plantaciones

La extracción del ADNg de los segmentos de hojas de banano infectadas, se realizó utilizando Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (Weising *et al.*, 1991). El tejido se maceró hasta un polvo fino en presencia de nitrógeno líquido y el macerado se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL conteniendo la solución de extracción. Los tubos se agitaron y

se incubaron a 65°C por 1 h. Concluido el tiempo de incubación, a cada tubo se le agregó 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v). Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min., se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos Eppendorf estériles. El sobrenadante se adicionó con isopropanol frío; y se colocó en hielo por 20 min. Los tubos se centrifugaron por 15 min a 13000 rpm; se decantó el sobrenadante y las pastillas resultantes (ADNg) se lavaron dos veces con etanol al 75%, las pastillas se centrifugaron por 5 min a 13000 rpm y se les removió el etanol residual. Las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendieron en agua bidestilada estéril. El ADN se trató con RNAsa A. Se determinó la concentración y calidad de ADN mediante geles de agarosa 1% y en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000) a 260/280 nm.

2.2.5 Amplificación por PCR en tiempo real del gen de la β-tubulina de *Mycosphaerella fijiensis* a partir del ADNg obtenido de las hojas de banano infectadas con *Sigatoka negra*

La amplificación por PCR en tiempo real se realizó siguiendo la metodología descrita por Arzanlou *et al.* (2007). Veinticinco nanogramos (25 ng) de ADNg se colocaron en una mezcla de reacción que contenía: 0.5µL (10µM) de los oligonucleótidos especie específicos MfbF5'-CGACACAGCAAGAGCAGCTTC-3' y MfBRtaq5'-TTCGAAAGCCTTGACTTCAA-3', 1.5 µL de amortiguador de PCR en tiempo real (10X), 0.8 µL de MgCl₂(50mM), 0.4 µL de dNTPs (10mM), 0.2 µL Taq polimerasa (5U/µl), 1.5µL de la sonda Taq-Man (1µM) [(MfbP5'-CTGAGCAGACTGACCACAACGCA-3', la cual está marcada con el reportero 6-carboxyfluoresceina (FAM) en el extremo 5' y con el colorante apagador "Drake deep" en el extremo 3'], 0.3 µL del colorante de referencia ROX (50X), 7.3µL de agua ultrapura estéril; el volumen final de la mezcla de reacción fue de 15 µL. Como control negativo se utilizó ADNg obtenido de plantas de banano sanas, otro control consistió en utilizar muestras de reacción sin DNA molde. Las condiciones de la PCR en tiempo real fueron 50°C, 2 min (1 ciclo), 95°C -10 min (1 ciclo), seguido de 40 ciclos de 95°C-15 seg, 60°C- 1 min. La reacción de PCR se realizó en placas MicroAmp Optical de 96 reacciones y cubiertas con la tapa óptica MicroAmp (Applied Biosystems). La medición de la fluorescencia se realizó en un ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

2.2.6 Cuantificación del ADNg de *Mycosphaerella fijiensis* por PCR en tiempo real

Se elaboró una curva estándar por PCR en tiempo real utilizando ADNg de *M. fijiensis*, disuelto en agua bidestilada estéril. Las concentraciones de ADNg utilizadas en la curva fueron 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/μl. La reacción de PCR en tiempo real se realizó utilizando las condiciones arriba descritas.

La curva estándar se construyó graficando el valor logarítmico de cada una de las concentraciones conocidas de ADNg 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 (log 1, 0, -1, -2 y -3 respectivamente) en el eje X, contra el valor Ct (ciclo umbral, el cual es el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente alcance el nivel umbral) en el eje Y obtenido para cada una de las diluciones de ADNg.

La eficiencia (E) de la PCR en tiempo real fue calculada con la ecuación:

$$E = (10^{-1/m} - 1)100$$

donde m es la pendiente de la ecuación de la curva estándar.

2.2.7 Cuantificación de la biomasa de *Mycosphaerella fijiensis*

Las muestras fueron cuantificadas interpolando los valores de Ct obtenidos por PCR en tiempo real en la ecuación de la curva estándar descrita arriba, a partir de la ecuación se determinó la cantidad de ADNg del hongo para cada una de las muestras de hojas de banano colectadas en Teapa. Estos resultados fueron interpolados en la ecuación de la segunda curva estándar que se obtuvo al graficar en el eje X la cantidad de tejido de *M. fijiensis* (mg) vs cantidad de ADNg (ng) en el eje Y, la ecuación de este gráfico permitió determinar la cantidad de biomasa de *M. fijiensis* en las hojas de banano colectadas en las plantaciones. La biomasa del patógeno en las muestras de campo fue expresado como (mg) en 250g de tejido de hoja de banano.

2.2.8 Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos de aplicación de fungicidas sobre las plantaciones (manejo intensivo, semi intensivo y rural), medido como la recuperación de biomasa total (promedio de los cinco cuadrantes muestreados) de *M. fijiensis* antes, durante y después de la aplicación de fungicidas fue evaluado por medio del análisis de varianza de una vía (One-Way ANOVA; SigmaStat 3.5). También se comparó el comportamiento de la biomasa de *M. fijiensis* entre cada uno de los cuadrantes del tratamiento semi intensivo e intensivo (comportamiento intrapoblacional, e interpoblacional) antes durante y después de la aplicación de los fungicidas sistémicos o de contacto. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba Student-Newman-Keuls, la diferencia fue considerada estadísticamente significativa cuando el valor de P era menor de 0.05.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Extracción de ADN a partir de las hojas de banano

Se extrajo ADN de 167 muestras de hojas de banano enfermas con Sigatoka negra colectadas en plantaciones de manejo intensivo, semi intensivo, y en la zona sin aplicación de fungicida (zona rural). La calidad del ADN extraído se verificó por medio de geles de 1% de agarosa (Figura 2.3); la concentración de ADN en las muestras y la pureza fue determinada en un espectrofotómetro NanoDrop 2000. La mayoría de las muestras presentaron relaciones 260/280 superiores a 1.70 (Cuadros 1, 2 y 3A ver ANEXO), lo que indica que se obtuvo ADN de buena calidad y pureza. Este resultado también se confirmó en los geles de agarosa donde se observaron bandas de ADN de alto peso molecular de acuerdo al marcador de tamaño (Figura 2.3), factor que sugiere una buena integridad del ADN. Algunas muestras presentaron una relación 260/280 superiores a 2; esto puede ser debido a la presencia de fenoles o carbohidratos. Sin embargo, dichas sustancias no interfirieron en la reacción de PCR en tiempo real ya que se logró amplificar el ADN de *M. fijiensis* y se detectó de manera eficiente.

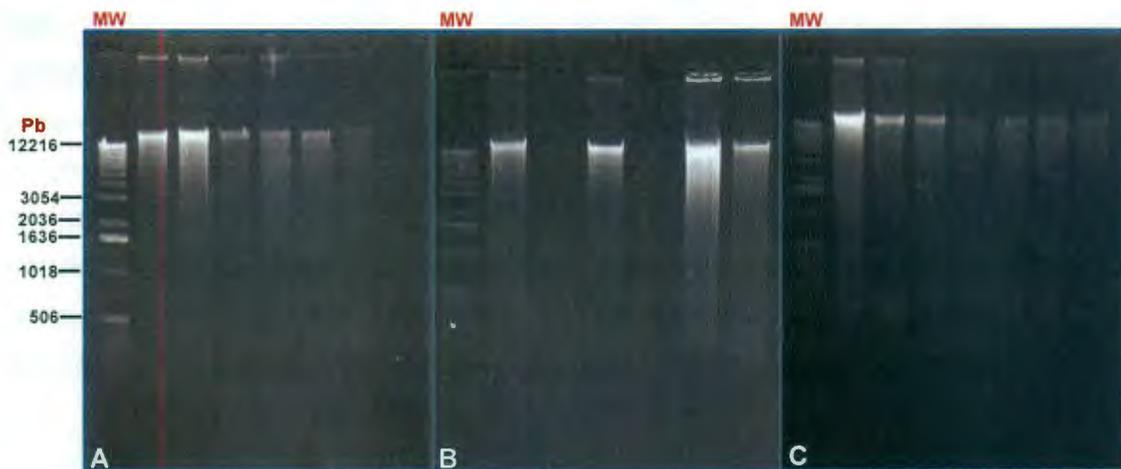


Figura 2.3 Imágenes de geles de 1% de agarosa mostrando el perfil de bandeo del ADN después de haber sido sometido a electroforesis. (A) ADN extraído de hojas de banano enfermas colectadas en la plantación con manejo intensivo de fungicida (B) de hojas de banano enfermas colectadas en la zona rural sin aplicación de fungicidas; (C) de hojas de banano enfermas colectadas en la plantación con manejo semi-intensivo. **MW**: Marcador de tamaño molecular.

2.3.2 Curva estándar para determinar la cantidad de ADN de *M. fijiensis* por PCR en tiempo real

La determinación de la cantidad de ADN de *M. fijiensis* en las muestras colectadas se realizó en la curva estándar elaborada a partir del valor logaritmo de las diluciones seriales de ADN de *M. fijiensis* (10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/ μ l) contra los valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos por PCR en tiempo real. Se observó una relación lineal entre los valores de Ct graficados contra el logaritmo de las diferentes cantidades de ADN de *M. fijiensis*. Los valores de Ct para las muestras 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng de ADN de *M. fijiensis* fueron 19.77, 22.83, 26.52, 29.64 y 32.61, respectivamente. El coeficiente de correlación (R^2) para la curva estándar fue de 0.99 (promedio de tres pruebas, realizadas de manera independiente y en cada prueba se incluyeron tres repeticiones). La eficiencia de la PCR para la curva de calibración en tiempo real fue de 103% (Figura 2.4).

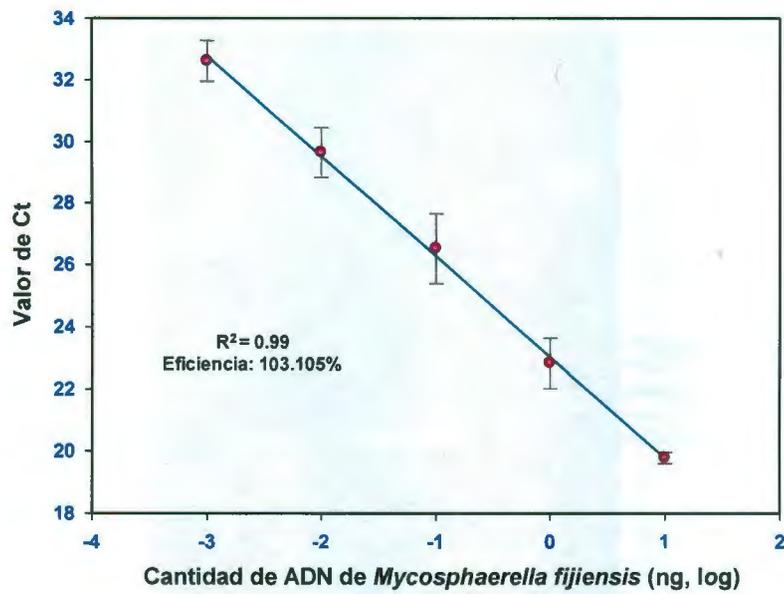


Figura 2.4 Curva estándar generada por PCR en tiempo real, a partir de diluciones seriales de cantidades conocidas de ADN de *M. fijiensis* e iniciadores específicos para el gen de la β -tubulina de dicho hongo. Se graficaron los valores de Ct contra el log de las cantidades conocidas de ADN de *M. fijiensis*.

Los productos de PCR en tiempo real, obtenidos durante la elaboración de la curva estándar fueron separados por electroforesis en un gel de 2% de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Se observó la amplificación de un fragmento de 134 pb el cual tiene el tamaño esperado para el fragmento del gen de la β -tubulina de *M.fijiensis*. Conforme la cantidad de ADN de *M. fijiensis* utilizada en la reacción fue disminuyendo, la abundancia del amplicón también disminuyó (Figura 2.5). Este resultado correlaciona con el resultado obtenido en la curva estándar, ya que a mayor cantidad de ADN menor el valor de Ct (Figura 2.4).

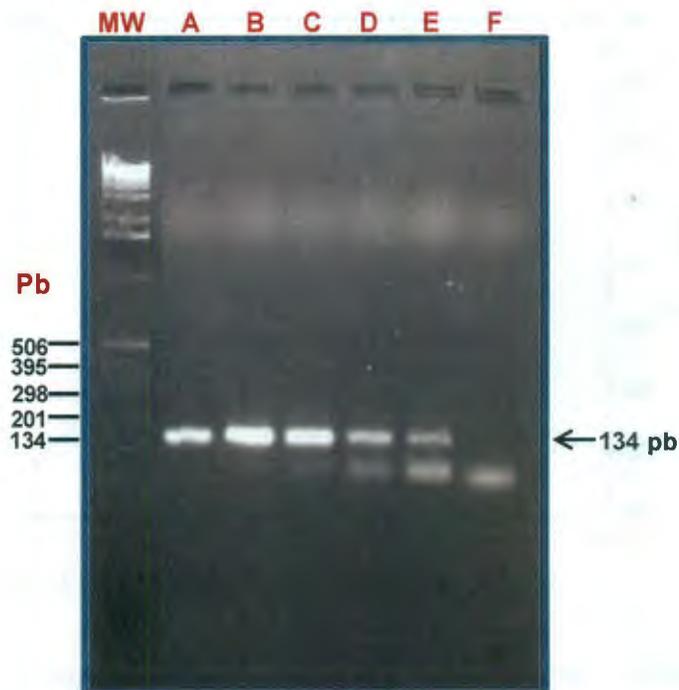


Figura 2.5 Imagen de un gel de 2% de agarosa en el cual se separaron por electroforesis los productos amplificados por PCR en tiempo real. Los carriles de **A** a **E** contienen al fragmento amplificado del gen de la β -tubulina de *Mycosphaerella fijiensis*. La amplificación se realizó a partir de diluciones seriales (10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/ μ l, respectivamente) del ADN de *M. fijiensis*. Carril **F** ADN de banano sano. (**MW**) Marcador de peso molecular. La flecha a la izquierda de la figura indica al amplicón esperado (134 pb).

La cantidad de ADNg de *M. fijiensis* en las muestras de ADN obtenidas de las hojas de banano colectadas en las plantaciones con aplicación semi intensiva, intensiva y sin aplicación de fungicidas fue determinada por PCR en tiempo real utilizando los iniciadores específicos para el gen de la β -tubulina de *M.fijiensis*; los valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos en la PCR en tiempo real fueron interpolados en la curva estándar, de esta forma se determinó la cantidad de ADNg de *M. fijiensis* presente en las muestras. Las señales de fluorescencia de las muestras colectadas en las condiciones descritas

previamente estuvieron sobre el umbral mínimo, dado que tuvieron valores de Ct entre 24 y 32. En contraste las muestras controles (muestras de ADN de banano sano y muestras sin templado) no produjeron señal de fluorescencia, hecho que evidencía la ausencia de amplificación.

2.3.3 Curva estándar para determinar la biomasa de *Mycosphaerella fijiensis*

La curva estándar elaborada con las cantidades de ADNg (ng) obtenidas a partir de diferentes cantidades de micelio de *M. fijiensis* (mg) (Figura 2.6) mostró una correlación lineal entre ambos parámetros. El análisis de regresión entre la cantidad de ADN y el micelio de *M. fijiensis* arrojó un coeficiente de correlación (R^2) de 0.98 (Figura 2.6). A partir de dicha curva se calculó la biomasa de *M. fijiensis* presente en las hojas de banano infectadas, al convertir los valores de Ct obtenidos en la PCR en tiempo real en cantidad de ADN y a partir de estos valores se determinó la biomasa utilizando la ecuación obtenida en la regresión de la Figura 2.6.

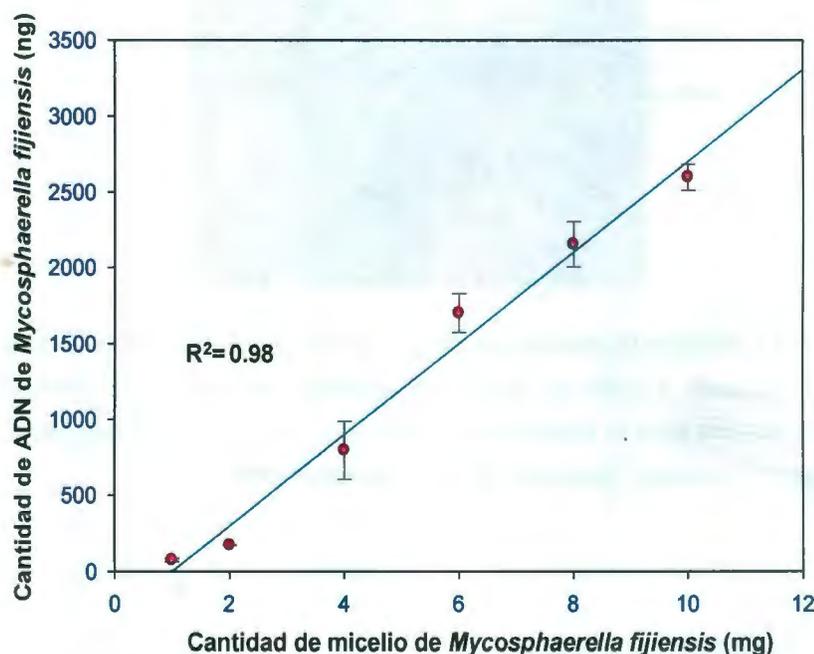


Figura 2.6 Curva estándar que relaciona la cantidad de ADNg de *M. fijiensis* con cantidad de micelio de *M. fijiensis*. La extracción del ADN se realizó en diferentes cantidades de micelio del hongo.

CAPÍTULO II

El ADN obtenido de las diferentes cantidades de micelio de *M. fijiensis* fue analizado en un gel de 1% de agarosa; las muestras de ADN presentaron una buena integridad pues se observaron bandas de alto peso molecular. Se observó que utilizando menor cantidad de micelio, hay menor intensidad de la banda de alto peso molecular debido a que en menor cantidad de tejido se obtiene menor cantidad de ADN (Figura 2.7). Este análisis confirmó el resultado obtenido durante la elaboración de la curva estándar (Figura 2.6).

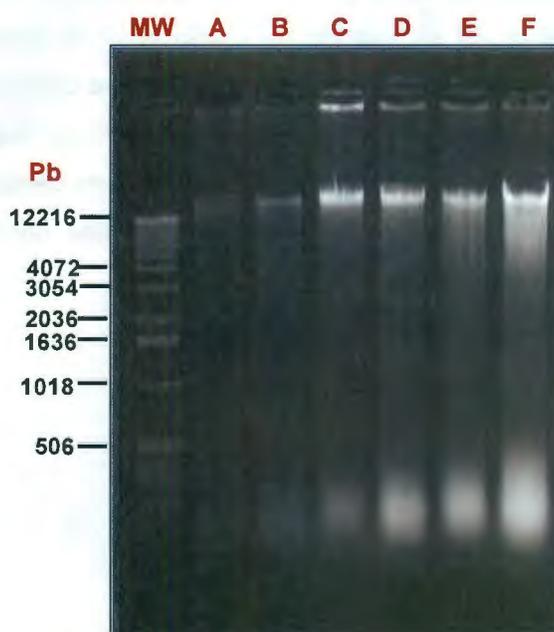


Figura 2.7 Análisis electroforético en gel de 1% de agarosa del ADN de *M. fijiensis* obtenido a partir de diferentes cantidades de micelio. La cantidad de micelio utilizado para la extracción de ADN fue: 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mg (carriles A a F, respectivamente). Marcador de peso molecular (MW).

2.3.4 Determinación de la biomasa de *M. fijiensis* en las hojas de banano enfermas de Sigatoka negra

Utilizando las curvas estándar (Figuras 2.4 y 2.6) se determinó la biomasa de *M. fijiensis* en las muestras de las hojas de banano que se colectaron en las plantaciones con los diferentes tratamientos de fungicida. La determinación de la biomasa en el tejido permitió inferir el efecto de los diferentes manejos de fungicidas y de la zona rural (sin aplicación de fungicidas).

La comparación de biomasa total (promedio que incluye las muestras de los cinco cuadrante) entre cada tiempo de aplicación de fungicida (antes, durante y después) de la Plantación de manejo semi intensivo mostró que la cantidad de biomasa total fue similar entre los diferentes tiempos de aplicación de fungicida (Figura 2.8); la comparación estadística por medio de la prueba ANOVA Student-Newman-Keuls ($P=0.05$) confirmó que no existen diferencias entre la biomasa detectada en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida en dicha plantación (Figura 2.8).

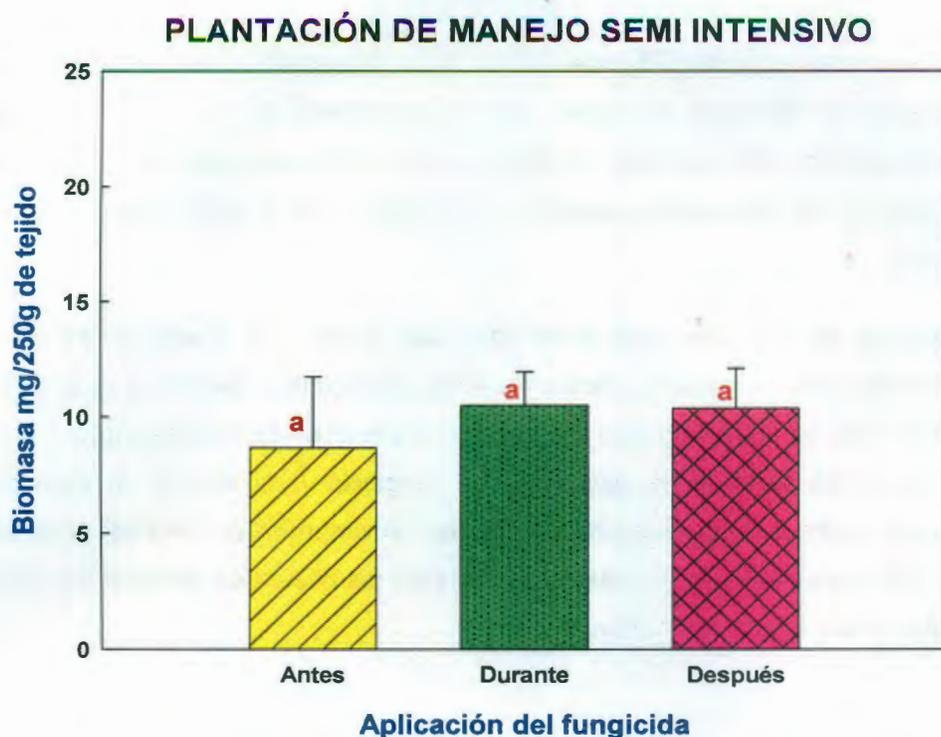


Figura 2.8 Comparación gráfica de la biomasa total de *M. fijiensis* en las muestras colectadas en la Plantación de manejo semi intensivo, en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida (antes, durante y después). Las barras que presentan letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

Un análisis más detallado de cada uno de los cuadrantes (cada cuadrante está integrado por cinco muestras) de la Plantación de manejo semi intensivo mostró que la cantidad de biomasa es diferente entre los cuadrantes en cada tiempo de aplicación del fungicida (antes, durante y después). Se observó mayor cantidad de biomasa en el cuadrante III, en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida. El análisis de varianza confirmó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los cuadrantes que integran la Plantación de manejo semi intensivo (Figura 2.9).

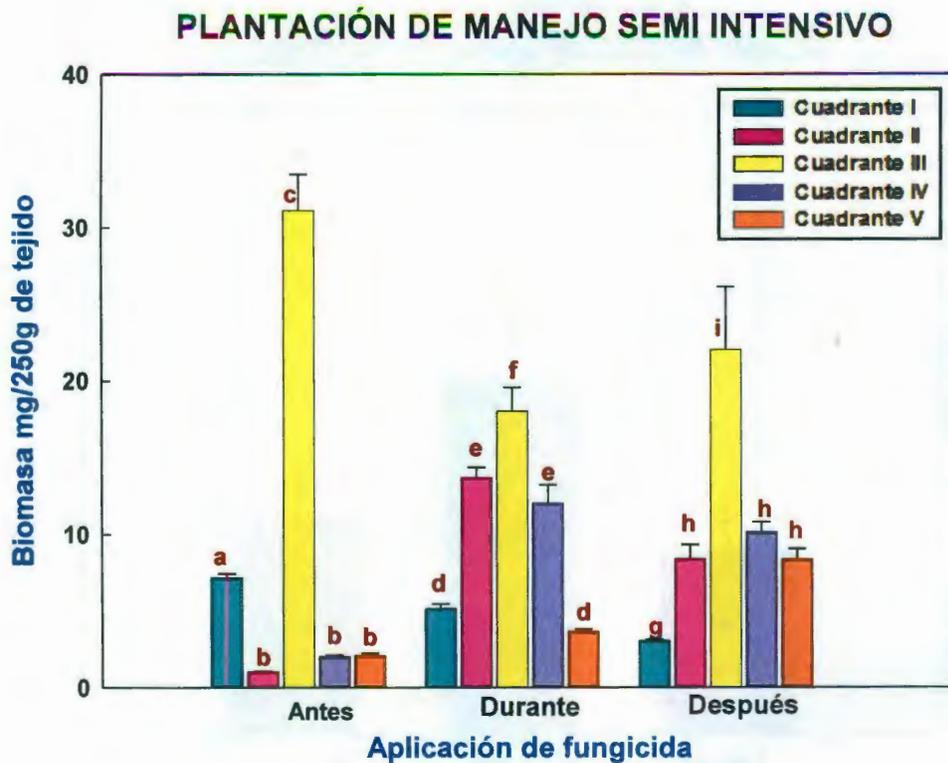


Figura 2.9 Comparación gráfica de la biomasa de *M. fijiensis* en las muestras de hojas de banano colectadas en cada cuadrante de la Plantación con manejo Semi intensivo, en diferentes momentos de de aplicación del fungicida. Las barras que presentan diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

En relación a la biomasa de *M. fijiensis* en las muestras de la Plantación con manejo intensivo de fungicidas el análisis reveló que no hay diferencias significativas en la biomasa total presente en el antes, durante y después de la aplicación del fungicida (Figura 2.10). No obstante, el análisis más detallado de la cantidad de biomasa presente en cada uno de los cuadrantes de la plantación, mostró diferencias entre cuadrantes en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida; la mayor diferencia de biomasa se detectó entre los cuadrantes del antes y después de la aplicación del fungicida (Figura 2.11).

PLANTACIÓN DE MANEJO INTENSIVO

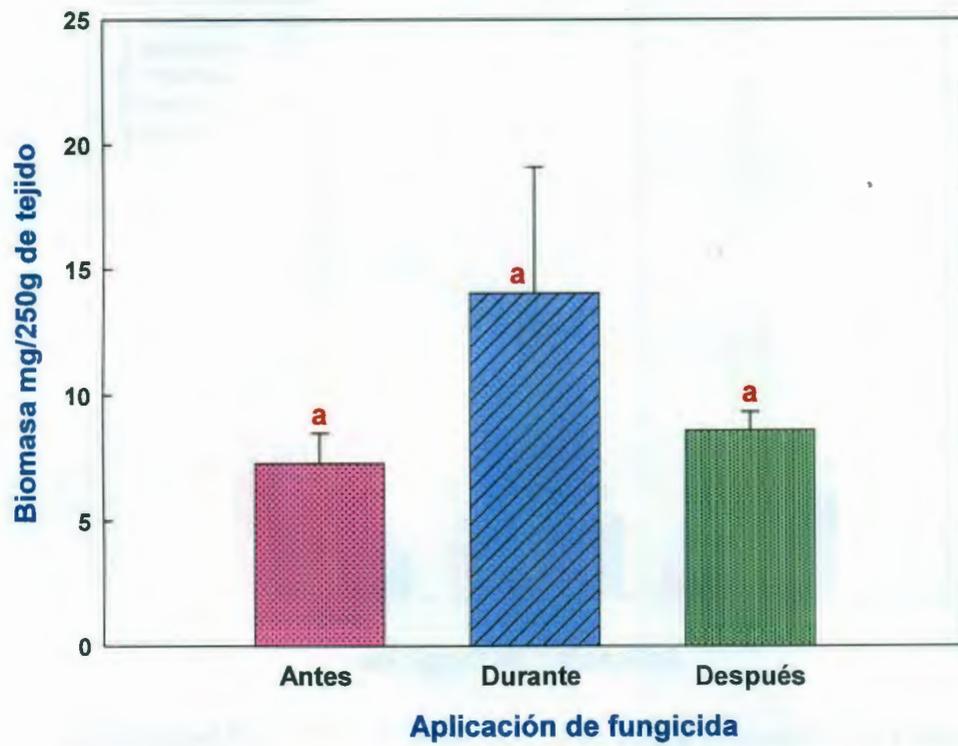


Figura 2.10 Comparación gráfica de la biomasa total de *M. fijensis* en las muestras colectadas en la Plantación de manejo intensivo, en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida (antes, durante y después). Las barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

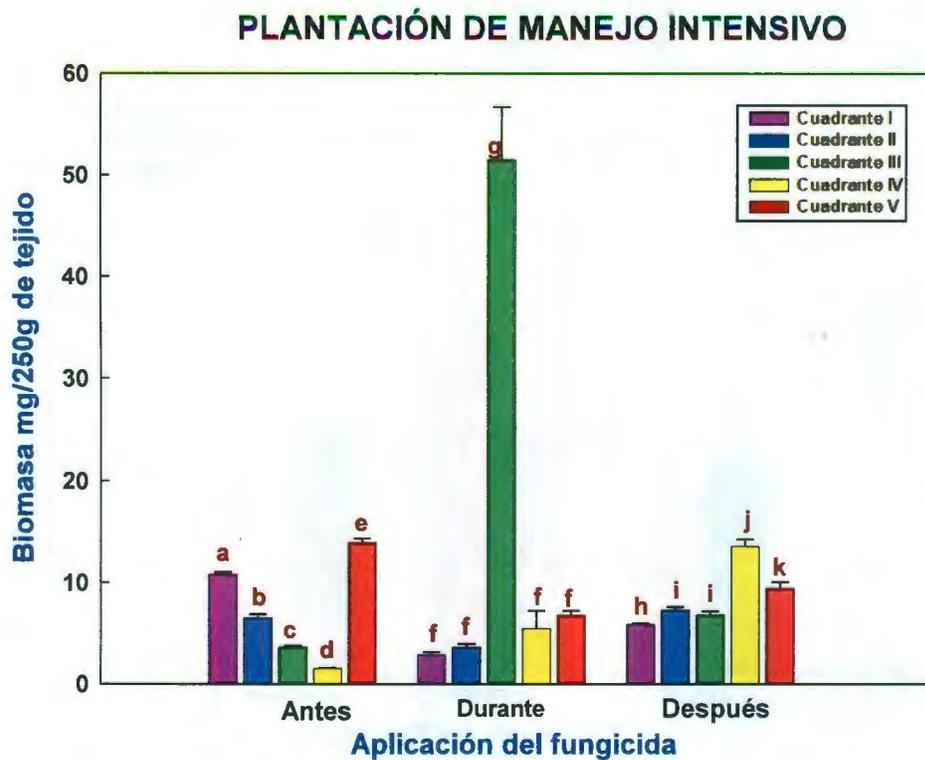


Figura 2.11 Análisis de la biomasa de *M. fijiensis* en cada uno de los cuadrantes de la plantación con manejo intensivo de fungicidas. Las barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

El análisis de varianza (ANOVA $P < 0.05$) confirmó que no existen diferencias significativas entre la cantidad de biomasa total de *M. fijiensis* en las Plantaciones de manejo semi intensivo e intensivo (Figura 2.12) y que este comportamiento se mantiene en los diferentes tiempos de aplicación de fungicida (antes, durante y después). En la figura 2.13 se muestra la gráfica de barras que representa la biomasa de *M. fijiensis* de la zona rural, la cual mostró una mayor biomasa que las otras dos plantaciones.

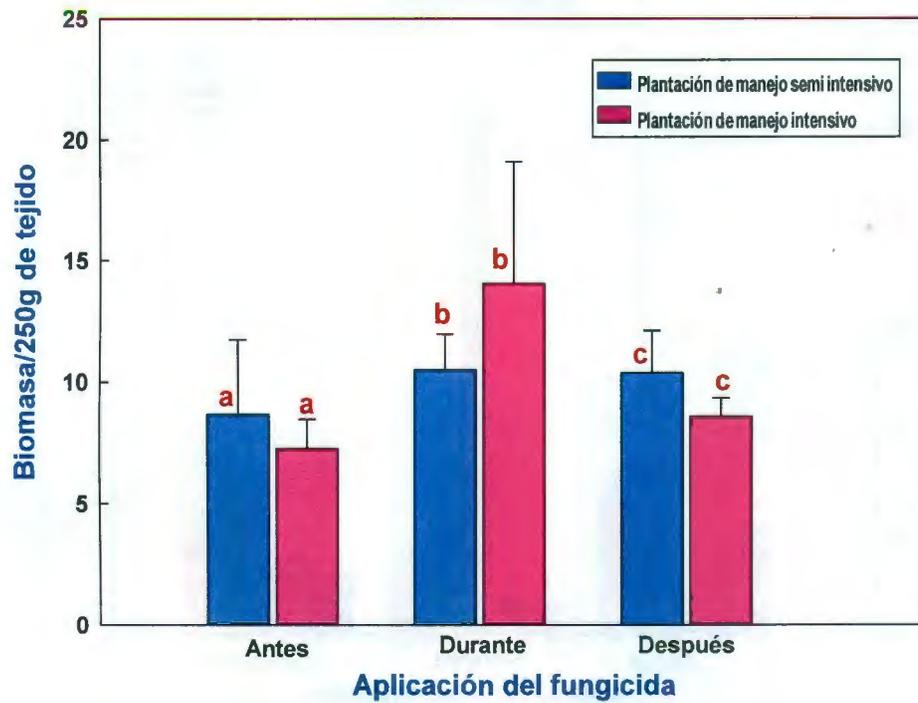


Figura 2.12 Comparación gráfica de la biomasa total de *M. fijiensis* presente en cada una de las plantaciones con diferente manejo antes, durante y después de la aplicación del fungicida. Las barra con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

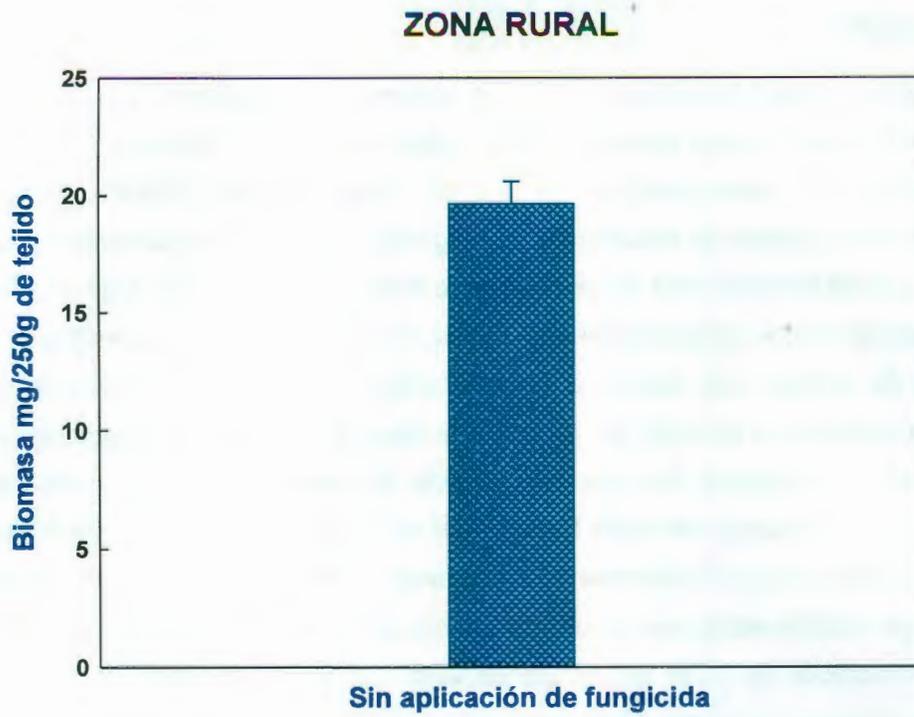


Figura 2.13 Representación gráfica de la biomasa de *M. fijiensis* cuantificada en las muestras colectadas en la zona rural.

2.4 DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar la biomasa de *M. fijiensis* en muestras que presentaban la enfermedad de la Sigatoka negra, y que fueron colectadas en plantaciones de banano de Teapa, Tabasco. Dichas plantaciones son mantenidas con diferente tratamiento de fungicida; esto permitió determinar el efecto de la aplicación de los diferentes fungicidas sobre la biomasa del hongo bajo condiciones de campo, elemento que generalmente representa un reto para los estudios de diversidad o densidad de poblaciones debido a las diferentes variables que inciden sobre los estudios. La utilidad de la PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de patógenos en la naturaleza ha sido demostrada en diversos estudios realizados en diferentes partes del mundo. Shishido Masahiro *et al.* (2009) describieron la cuantificación por PCR en tiempo real de la biomasa de *Phomopsis sclerotioides* en plantas y en suelo. En su estudio establecieron que el utilizar curvas estándar con diluciones seriales de cantidades conocidas de ADN del hongo vs valor de Ct (ciclo umbral) y curvas con diferentes cantidades del micelio (mg) del hongo vs cantidad de ADN estimado (ng) es un método pertinente para detectar y cuantificar la biomasa del hongo presente en las plantas.

La aplicación de la estrategia arriba descrita para el estudio de la interacción banano-*M. fijiensis*, en este caso en muestras de campo colectadas en Teapa, Tabasco, permitió realizar comparaciones de la biomasa del patógeno presente en plantaciones con diferente régimen de aplicación de fungicidas. Aunque los resultados no revelaron diferencias entre los tratamientos si se determinó la biomasa de *M. fijiensis* en las plantaciones estudiadas; Arzanlou *et al.*, (2007) también lograron cuantificar la biomasa de *M. fijiensis* en las hojas de banano con síntomas de Sigatoka negra y colectadas en condiciones de campo.

En la Plantación de manejo semi intensivo no se observaron diferencias drásticas en la cantidad de biomasa total entre los diferentes tiempos de aplicación de fungicida (antes, durante y después) (Figura 2.8). Sin embargo, un análisis más detallado del muestreo entre cuadrantes mostró diferencias de biomasa entre los cuadrantes antes, durante y después de la aplicación de fungicida (Figura 2.9). Dicha observación sugiere que la

distribución de la biomasa de *M. fijiensis* en las plantas enfermas de la plantación es variable. Este comportamiento pudiera obedecer a que *M. fijiensis* mantiene una distribución poblacional heterogénea en la plantación debido a factores de microclima mismos que determinan la distribución del patógeno.

La biomasa total presente en la Plantación de manejo intensivo mostró un incremento durante la aplicación del fungicida, esto pudo ser consecuencia de la heterogeneidad del material vegetal colectado. El análisis estadístico ANOVA ($P=0.05$) determinó que no hay diferencias significativas entre los diferentes tiempos de aplicación del fungicida (Figura 2.10), esto puede deberse a la desviación estándar obtenida durante la cuantificación de la biomasa de las muestras colectadas durante la aplicación del fungicida. La amplitud de los valores de la desviación estándar puede estar reflejando diferencias importantes en las muestras analizadas.

Otra posibilidad que permitiría explicar la falta de diferencia entre la biomasa total cuantificada en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida pudiera ser el hecho de que el hongo hubiera desarrollado resistencia al fungicida empleado (sistémico) en esta plantación, ya que visualmente se percibió que la aplicación del fungicida parecía ser ineficiente, dado que en la plantación había un número importante de plantas con síntomas avanzados de la enfermedad. Una última posibilidad podría estar asociada a que las hojas colectadas ya tenían síntomas avanzados de la enfermedad y que por ello el fungicida sistémico ya no tuviera efecto, dado su mecanismo de acción de depositarse o translocarse entre tejidos vivos. Por otra parte, también se observó que la distribución del patógeno en las plantas de cada cuadrante de dicha plantación fue heterogénea (Figura 2.11). Dicho resultado es similar al observado en los cuadrantes de la Plantación de manejo semi intensivo y podría explicarse en términos similares a los empleados para explicar las diferencias en la Plantación de manejo semi intensivo.

La comparación de la biomasa de *M. fijiensis* en las plantaciones que emplean diferentes tratamientos para controlar la enfermedad de la Sigatoka negra mostró que no hay diferencias significativas entre las muestras colectadas antes, durante y después de la aplicación del fungicida (Figura 2.12), esto puede ser consecuencia de que la colecta del material vegetal en la Plantación de Manejo semi intensivo se realizó en una zona en la cual la aplicación del fungicida no es suficiente o no llega lo suficiente como para controlar

CAPÍTULO II

la enfermedad; dicha zona se localiza a la orilla de la carretera y de la plantación; es bien sabido que en estas áreas la fumigación aérea se encuentra sujeta a regulación oficial y debe obedecer las restricciones legales. Es posible que debido a ello la incidencia de la enfermedad fuera parecida a la registrada en la Plantación de Manejo intensivo. En contraste, en la zona rural, la cual no recibe aplicación de fungicida se determinó una biomasa de *M. fijiensis* mayor a las otras dos plantaciones comerciales.

Con los resultados obtenidos a partir de este primer muestreo no se pudo determinar que tratamiento resultó mejor para el control de la Sigatoka negra; sin embargo, en esta primera colecta sí se identificaron los factores que se deben considerar a la hora de realizar los muestreos, esto con el propósito de tener resultados más representativos. Otra parte importante a considerar es la extracción de ADN de alta calidad para la realización de los ensayos de cuantificación del patógeno (Waalwijk *et al.*, 2004). En esta primera parte se consiguió estandarizar el protocolo de extracción de ADN total (interacción *Musa-M. fijiensis*) y con este protocolo se analizaron las muestras de hojas de banano colectadas en campo. La determinación específica del ADN de *M. fijiensis* en las mezclas de ADN, así como la determinación de su biomasa en las plantaciones de banano con diferente manejo de fungicidas y aún entre los individuos que están dentro de una misma plantación, permiten concluir que la metodología implementada para la realización de este estudio es un método confiable que puede ser aplicado de manera más extensa en las diferentes áreas de cultivo de banano.

BIBLIOGRAFÍA

- Arzanlou M., Waalwijk C., Guzmán M., W. Crous P., Carlier J. (2007). Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*, 97: 1112-1118.
- Cabrera M. (2004). Importancia del cultivo de banano en México. In: Memorias curso de aprobación y renovación para el manejo fitosanitario de banano, Huehuetán, Chiapas, México, 1-36.
- Cañas-Gutiérrez G. P., Patiño L. F., Rodríguez-Arango E., Arango R. (2006). Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *Journal of Phytopathology*, 154: 403-409.
- Islas Flores I., Peraza Echeverría L., Canto Canché B., Rodríguez García C. (2006). Extraction of high-quality, melanin free RNA from *Mycosphaerella fijiensis* for cDNA preparation. *Molecular Biotechnology*, 34: 45-50.
- Johanson A., Jeger J. (1993). Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spot in banana and plantain. *Mycological Research*, 97(6): 670-674.
- Orozco-Santos M. (1998). Manejo integrado de la Sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Folleto técnico No. 1. 95.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2010). <http://www.siap.sagarpa.gob.mx> (consultado en enero 2012).
- Shishido M., Sato K., Yoshida N. (2009). PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotoides* in plants and soil. *The Phytopathological Society of Japan and Springer*, 76: 21-30.
- Waalwijk C., Van der Heide R., De Vries I., Van der Lee T., Schoen C., Costrel de Corainville G., Häuser-Hahn I., Kastelein P., Köhl J., Lonnet P., Demarquet T. and Kema G. (2004). Quantitative detection of *Fusarium* species in wheat using

CAPÍTULO II

TaqMan. *European Journal of Plant Pathology* , 110: 481-494.

Weising K., Kaemmer D., Epplen J.T., Weigand F., Saxena M.C., Kahl G. (1991). DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligonucleotides. *Curr Genet.* 19:483-489.

CAPÍTULO III

CUANTIFICACIÓN DE LA BIOMASA DE *M. FIJENSIS* EN HOJAS DE BANANO COLECTADAS EN 2011 EN PLANTACIONES DE BANANO CON DIFERENTE MANEJO DE FUNGICIDAS Y LOCALIZADAS EN TEAPA, TABASCO

3.1 INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra presenta una amplia distribución en todo el mundo (Jácome, 2003) y está considerada como una de las enfermedades más devastadoras que afectan a las plantaciones de banano a nivel mundial (Pasberg-Gaul *et al.*, 2000); dicha enfermedad es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, y ocasiona pérdidas en la producción de fruto e incremento en los costos de producción. Actualmente el control químico es la alternativa más común en las plantaciones comerciales de banano (Martínez *et al.*, 2011).

Debido a los problemas ambientales que ocasionan los fungicidas, como son la aparición de cepas resistentes, se busca disminuir el uso indiscriminado de los mismos, concientizando a los productores para minimizar la cantidad de productos químicos que aplican, así como disminuir el número de aplicaciones. Con el fin de implementar dicha medida es necesario encontrar las condiciones y las estrategias que permitan determinar la cantidad de inóculo del patógeno en las áreas de cultivo donde se aplican los fungicidas. Es por ello que en este trabajo se propuso cuantificar la biomasa de *M. fijiensis* en plantaciones de banano ubicadas en el municipio de Teapa, Tabasco y que se mantienen con diferente manejo con respecto a la aplicación de fungicidas (manejo semi intensivo e intensivo) y en una zona rural sin aplicación de fungicida. Se colectaron segmentos de hojas de banano y a partir de ese material vegetal se realizó la extracción de ADN para posteriormente por PCR en tiempo real cuantificar la cantidad de biomasa de *M. fijiensis* presente en dichos tejidos. A través de dicha metodología se determinó si la aplicación diferencial de fungicidas en dichas plantaciones es un factor que incide o no sobre la biomasa de *M. fijiensis*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Colecta del material vegetal

Las hojas de banano Enano Gigante fueron colectadas durante el mes de julio de 2011 en la zona de Teapa Tabasco, durante la época de alta precipitación pluvial (8.9 mm), en las mismas plantaciones muestreadas en el año 2010. Se colectaron segmentos de hoja de banano; la colecta se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos del capítulo II y con los ajustes que se determinó eran necesarios para la realización de muestreos más representativos. El material se colectó antes, durante y después de la aplicación de los fungicidas.

En la plantación San Juanito, clasificada como de manejo semi intensivo, se realiza la aplicación consecutiva de fungicida de contacto (Mancozeb) cada nueve días. Dicho criterio es el mismo que se seguía en la colecta realizada en el año 2010, con excepción de que la aplicación del fungicida se realizaba cada siete días.

En contraste, la plantación San Fernando, clasificada previamente como de manejo intensivo, no mantuvo el mismo criterio de aplicación de fungicidas que tenía en el año 2010. En dicho año esta plantación recibió mezcla de fungicida tanto de contacto como sistémico y 15 aplicaciones de fungicida sistémico Folicur. En el presente muestreo (año 2011), dicha plantación recibió aplicación mezclada de fungicida sistémico (Opus) y de contacto (Mancozeb), el fungicida de contacto fue aplicado cada 9 días, mientras que el sistémico fue aplicado como máximo 4 veces durante el año. Al momento del muestreo dicha plantación recibió la tercera aplicación del fungicida sistémico (se aplicó fungicida sistémico en enero, abril y julio); la última aplicación se realizaría en el mes de diciembre (información proporcionada por el administrador de la finca). La zona rural Puyacatengo se muestreó como control, dado que no recibe fungicidas.

Se colectó un total de 170 muestras de hojas de banano en las plantaciones y en la zona rural. El material vegetal fue transportado al laboratorio en donde se realizaron los análisis posteriores.



Figura 3.1 Imágenes de plantaciones de banano del municipio de Teapa, Tabasco. **(A)** Plantación San Juanito, con manejo semi intensivo de fungicida. **(B)** Plantación San Fernando, con manejo intensivo. **(C)** San José Puyacatengo, zona rural sin aplicación de fungicida. **(D)** Empacadora San Juanito.

3.2.2 Cuantificación de la biomasa de *M. fijiensis* en las muestras colectadas

La cuantificación de la biomasa de *M. fijiensis* en las muestras colectadas en las diferentes plantaciones fue realizada de la manera que se describió en el apartado de materiales y métodos del capítulo II. El ADNg de las muestras de hojas de banano se extrajo utilizando el método del CTAB (Weising *et al.*, 1991). A partir del ADNg recuperado se amplificó por PCR en tiempo real al gen de la β -tubulina de *M. fijiensis*. Los resultados fueron interpolados en una curva estándar elaborada con diluciones seriales de una concentración conocida de ADNg de *M. fijiensis*, esta curva permitió determinar la cantidad de ADN del patógeno presente en las muestras (Arzanlou *et al.*, 2007). Para la determinación de la biomasa del patógeno fue necesario interpolar dichos resultados en una segunda curva estándar, realizada siguiendo el protocolo descrito por Shishido-

CAPÍTULO III

Masahiro *et al.* (2009); dicha curva se realizó extrayendo ADNg a partir de diferentes cantidades de micelio de la cepa C1233 de *M. fijiensis* (Cantidad de tejido de *M. fijiensis* vs Cantidad de ADN).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción de ADNg a partir del material vegetal colectado

Las muestras colectadas (170 en total) en las plantaciones de banano con diferente manejo de fungicida y de la zona rural fueron homogenizadas tal como se describió en materiales y métodos en el capítulo II. Tanto la integridad como la concentración del ADNg recuperado fueron verificados para cada una de las muestras por medio de electroforesis en geles de 1% de agarosa (Figura 3.2) y a través de su análisis a 260/280 nm en un nanodrop, respectivamente. Las muestras de ADN presentaron buena integridad, dado que en el gel de agarosa se observaron bandas de alto peso molecular y escasa o nula degradación (Figura 3.2). En el análisis a 260/280 nm la mayoría de las muestras presentaron lecturas superiores a 1.70 (Cuadros 3B, 4 y 5; ver anexos). Dado el resultado todas las muestras de ADN fueron utilizadas para la realización de las reacciones de PCR en tiempo real y con ello se determinó la cantidad de ADNg de *M. fijiensis* presente en las muestras colectadas durante el año 2011.

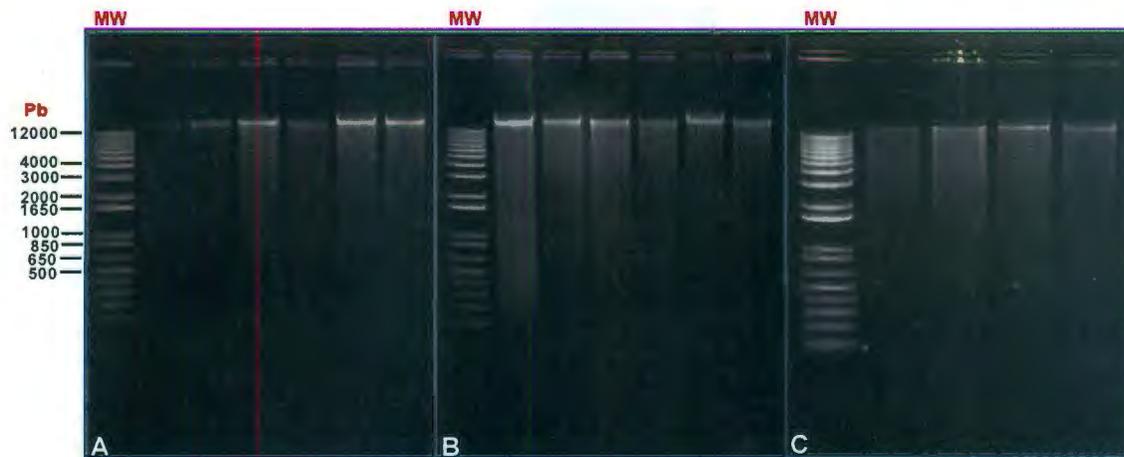


Figura 3.2 Análisis en gel de agarosa de 1% de la integridad del ADN extraído de las hojas de banano enfermas de Sigatoka negra. (A) ADN extraído de las muestras colectadas en la plantación con manejo semi intensivo de fungicida; (B) muestras colectadas en la plantación con manejo intensivo de fungicida; (C) muestras colectadas en la zona rural sin aplicación de fungicidas. **MW**: Marcador de peso molecular.

3.3.2 Curva estándar para la cuantificación de ADN_g de *M. fijiensis* por PCR en tiempo real

La curva estándar fue realizada a partir de diluciones seriales de una concentración conocida de ADN_g de *M. fijiensis* (10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 ng/ μ l). Dicha curva mostró un coeficiente de correlación (R^2) de 0.99 y tuvo una eficiencia de 91.145% al graficar los valores de Ct obtenidos por la reacción de PCR en tiempo real vs el logaritmo de las cantidades conocidas de ADN_g de *M. fijiensis* (Figura 3.3). En los controles negativos (muestra de agua y ADN_g de hoja de banano sano) se observó ausencia de amplificación. La ecuación obtenida en la curva estándar fue usada para determinar la cantidad de ADN_g de *M. fijiensis* en las muestras de hojas de banano colectadas en las diferentes plantaciones.

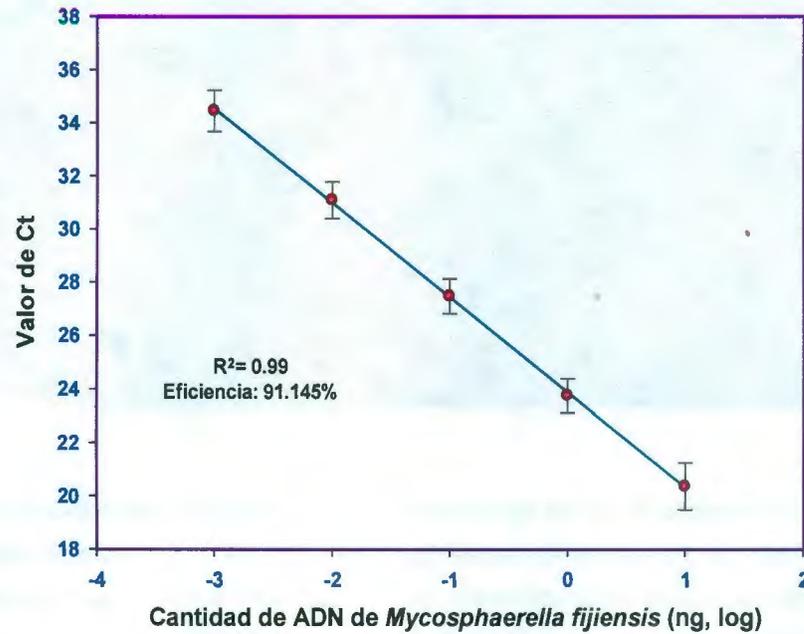


Figura 3.3 Curva estándar generada con los valores de C_t vs el log de las cantidades de ADN de *M. fijiensis*.

3.3.3 Determinación de la biomasa de *Mycosphaerella fijiensis* en el material vegetal colectado

A partir de la curva estándar generada por PCR en tiempo real (Figura 3.3), se cuantificó el ADN de *M. fijiensis* en las muestras colectadas en las plantaciones con diferente manejo de fungicidas y en la zona rural. Los valores resultantes de ADN fueron interpolados en la ecuación de la curva estándar mostrada en el capítulo II (Figura 2.6), y que relaciona la cantidad de micelio con respecto a su contenido de ADN. A partir de dicho gráfico se determinó la cantidad de biomasa de *M. fijiensis* en las hojas de banano con síntomas de Sigatoka negra.

En la plantación de manejo semi intensivo ("San Juanito") la biomasa total (promedio de los cinco cuadrantes) de *M. fijiensis* fue similar antes y después de la aplicación del fungicida; no obstante, durante la aplicación del fungicida la biomasa de *M. fijiensis* disminuyó. El análisis de varianza ANOVA ($P=0.05$) confirmó que no existe diferencias significativas entre los tratamientos del "antes" y el "después" de la aplicación de fungicidas, pero sí para el de "durante" la aplicación del fungicida (Figura 3.4)

observándose una disminución cercana al 36%.

La comparación de la biomasa de *M. fijiensis* en los cinco cuadrantes muestreados en la Plantación de manejo semi intensivo mostró que la biomasa es diferente en cada cuadrante, observándose mayores diferencias entre los cuadrantes muestreados después de la aplicación del fungicida (Figura 3.5). Los análisis estadísticos de ANOVA ($P=0.05$) confirmaron las diferencias en biomasa entre los cuadrantes.

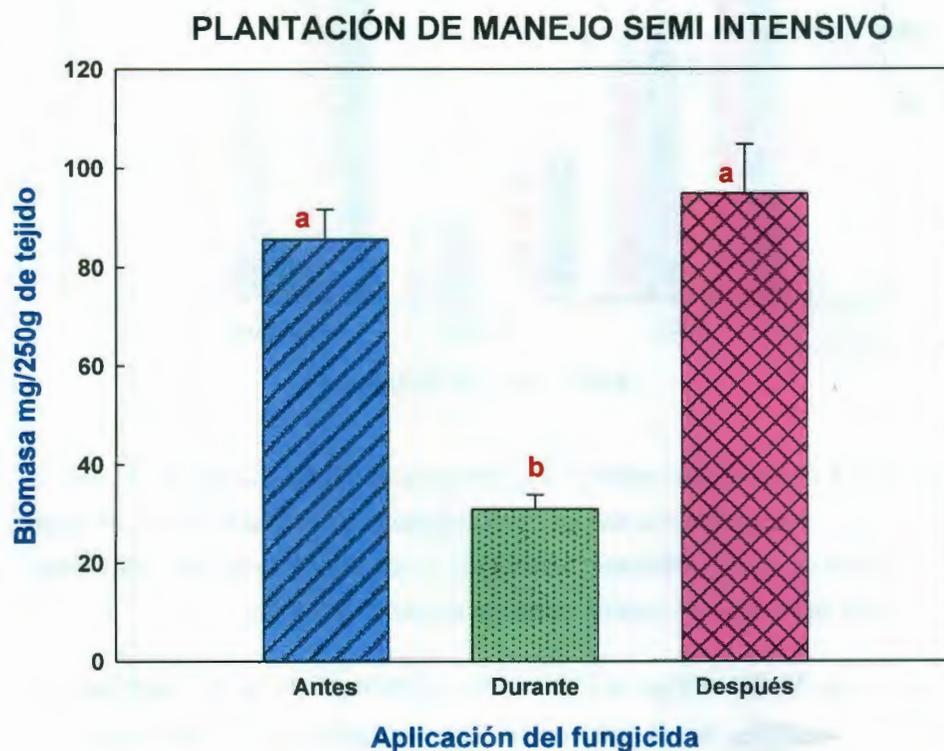


Figura 3.4 Comparación gráfica de la biomasa total de *M. fijiensis* en las muestras de banano colectadas en las diferentes etapas de aplicación de fungicida en la Plantación de manejo semi intensivo. Las barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P<0.05$).

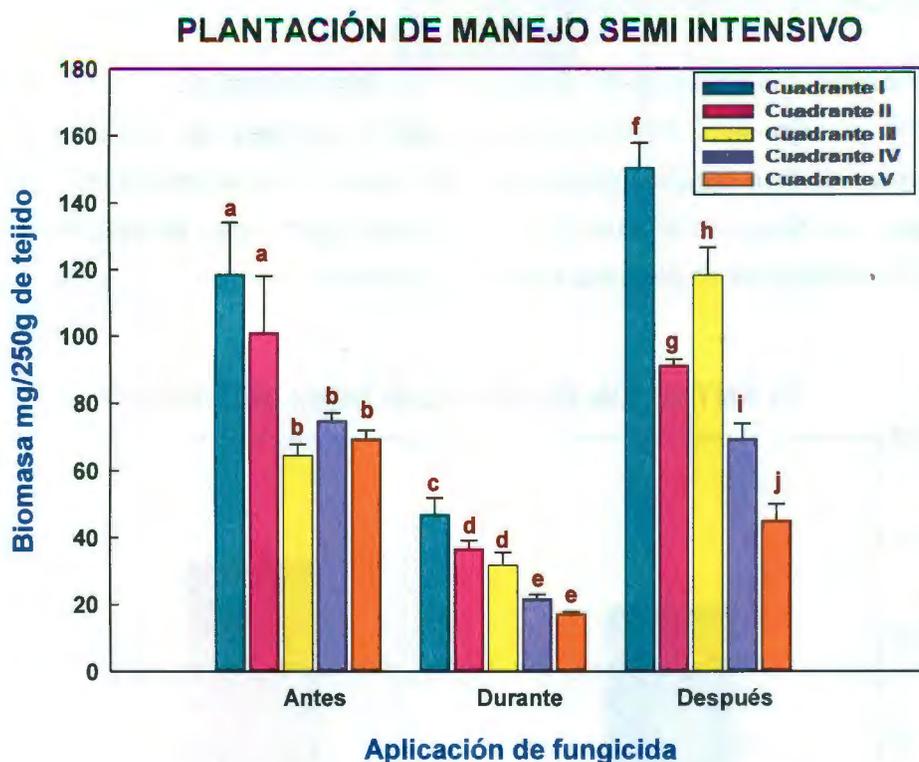


Figura 3.5 Comparación gráfica de la biomasa de *M. fijiensis* en las muestras de hojas de banano colectadas en cada cuadrante de la Plantación de manejo semi intensivo, en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida. Las barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

La biomasa total de *M. fijiensis* en la Plantación de manejo intensivo (“San Fernando”), fue similar antes y después de la aplicación del fungicida, pero disminuyó durante la aplicación del fungicida en 47%; el análisis de varianza confirmó dichos resultados al mostrar que no existen diferencias significativas antes y después de la aplicación del fungicida. En contraste, dicho análisis mostró diferencias significativas en la comparación de la biomasa total del antes y el después con respecto a la biomasa obtenida durante la aplicación del fungicida (Figura 3.6).

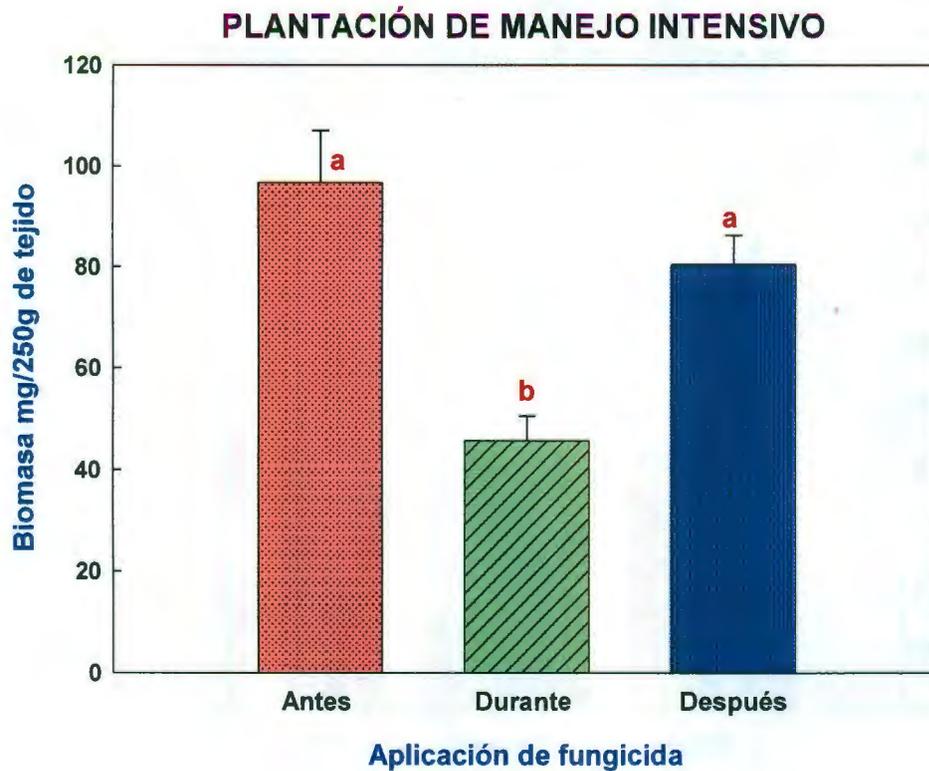


Figura 3.6 Comparación gráfica de la biomasa total de *M. fijiensis* contenida en las muestras colectadas en la Plantación de manejo intensivo, en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida (antes, durante y después). Las barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

La biomasa para cada cuadrante de la Plantación de manejo intensivo mostró que hay diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$), observándose mayor diferencias en las muestras colectadas en los cuadrantes del durante y después de la aplicación del fungicida (Figura 3.7).

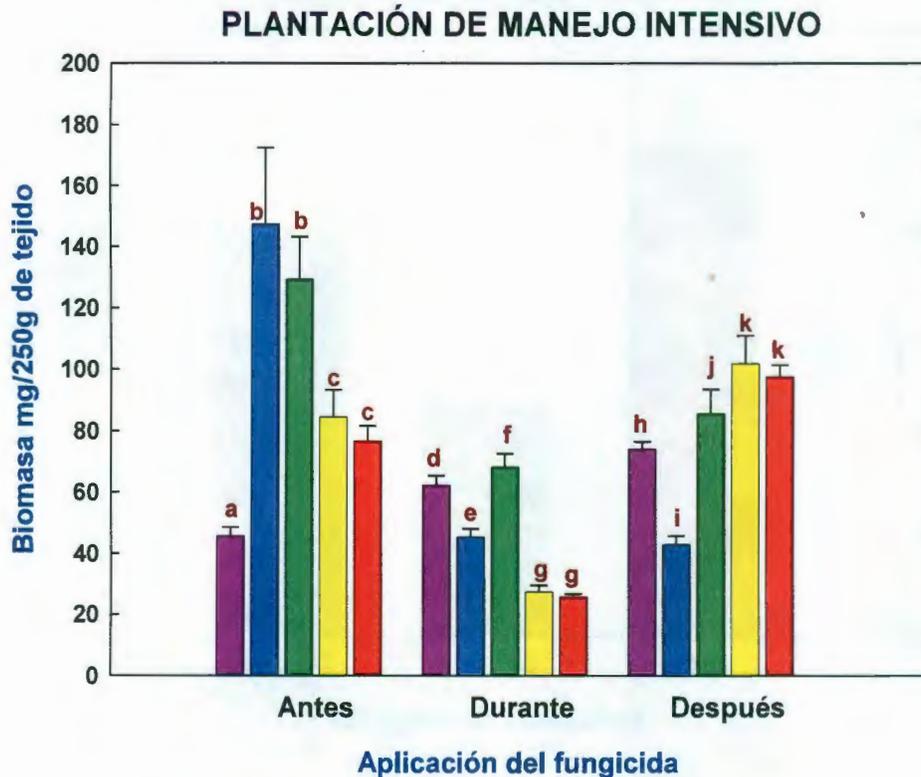


Figura 3.7 Comparación gráfica de la biomasa de *M. fijiensis* contenida en las muestras de hojas de banano colectadas en cada cuadrante de la Plantación de manejo intensivo, en los diferentes tiempos de aplicación del fungicida. Las barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

La comparación del comportamiento de la biomasa total de *M. fijiensis* entre las Plantaciones de manejo semi intensivo e intensivo no mostró diferencias significativas en la cantidad de biomasa determinada antes y después de la aplicación del fungicida, observándose biomasa similar en cada momento. En contraste, durante la aplicación del fungicida se observó que la cantidad de biomasa fue mayor en la Plantación de Manejo intensivo con respecto a la Plantación de Manejo semi intensivo (Figura 3.8) y los análisis estadísticos confirmaron dichos resultados, determinando que existen diferencias significativas de biomasa entre las plantaciones durante la aplicación del fungicida. En ambas plantaciones la cantidad de biomasa disminuyó durante la aplicación del fungicida.

La zona rural mostró una biomasa de *M. fijiensis* menor a la determinada en las plantaciones con diferente manejo de fungicida (Figura 3.9).

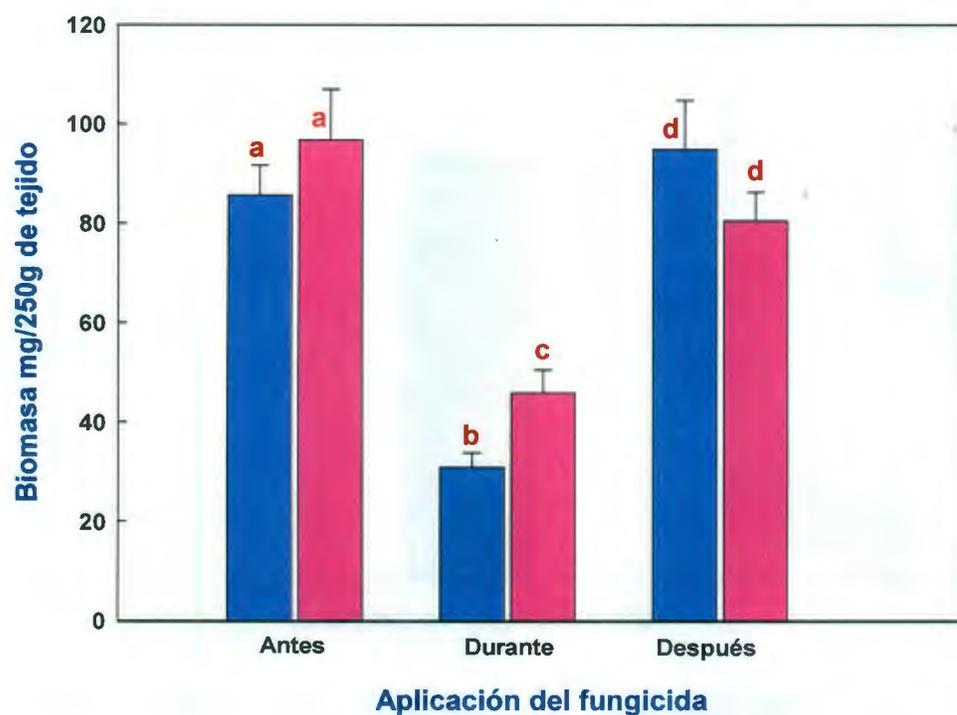


Figura 3.8 Comparación gráfica de la biomasa total de *M. fijiensis* presente en cada una de las plantaciones antes, durante y después de la aplicación del fungicida. Las barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

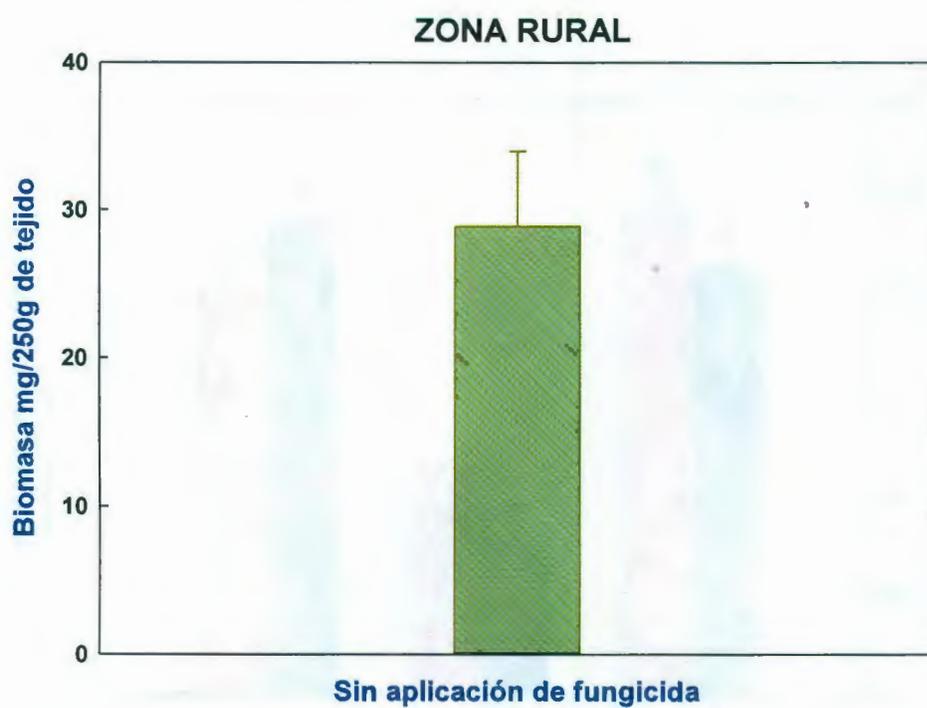


Figura 3.9 Gráfica que muestra la biomasa de *M. fijiensis* en las muestras colectadas en la zona rural.

3.4 DISCUSIÓN

La colecta del material vegetal se realizó en el mes de julio de 2011, periodo de lluvias cuando las condiciones climatológicas son favorables para el desarrollo de la Sigatoka negra. Cabe mencionar que en este muestreo se tomaron en cuenta los requerimientos que son necesarios para la colecta del material vegetal, los cuales no se realizaron de forma correcta en la colecta del año 2010. Los ajustes realizados ayudaron a mejorar la estrategia experimental y de muestreo en 2011. Un aspecto importante a considerar es que en lo que respecta a la Plantación de Manejo Intensivo ("San Fernando"); por cuestiones ajenas a este estudio presentó cambios en cuanto al control de la Sigatoka negra, ya que en la colecta realizada en el 2010, esa plantación recibió durante el año 15 aplicaciones de fungicida sistémico; en cambio para la colecta del 2011 recibió solo 4 aplicaciones de fungicida sistémico al año; este cambio pudo ser un factor que influyó en los resultados de la biomasa obtenida en la colecta de 2011.

Al realizar la comparación de los tratamientos contra la Sigatoka negra de las Plantaciones de manejo semi intensivo e intensivo de fungicidas ésta mostró que no hay diferencias en lo referente a la cantidad de biomasa en ambas plantaciones en los tiempos de aplicación de fungicida (antes y después) (Figura 3.8). Dicho resultado refleja que el cambio de manejo de la Sigatoka negra en la Plantación de manejo intensivo hace que su tratamiento sea similar al de la Plantación de manejo semi intensivo. Esta suposición se basa en el hecho de que al modificarse el programa de aplicación de fungicida y recibir solo 4 aplicaciones de fungicida sistémico al año y el resto de aplicaciones de fungicidas de contacto (cada 9 días al igual que la otra plantación) ocasionó que el comportamiento de *M. fijiensis* fuera similar al observado en la Plantación de manejo semi intensivo. Ambas plantaciones mostraron una disminución de biomasa durante la aplicación del fungicida, reflejando el efecto del fungicida (Figura 3.8), no obstante, durante la aplicación del fungicida se observó mayor cantidad de biomasa en la Plantación de manejo intensivo que en la de manejo semi intensivo. El resultado obtenido puede deberse a los diferentes fungicidas empleados, ya que durante el muestreo en la Plantación de manejo semi intensivo se aplicó fungicida de contacto y en la de manejo intensivo fungicida sistémico, lo que sugiere que la biomasa presente en la Plantación de manejo intensivo podría ser patógeno resistente al fungicida sistémico, pues se ha reportado que dichos fungicidas ocasionan cepas resistentes (Bellaire *et al.*, 2010), o

CAPÍTULO III

podría deberse a que en ciertas muestras el fungicida no presentó el mismo efecto debido a que los fungicidas sistémicos son menos eficientes en las lesiones más avanzadas de la enfermedad.

En lo que respecta a la zona rural, sin la aplicación del fungicida, ésta mostró resultados contrarios a los esperados, dado que la cantidad de biomasa de *M. fijiensis* fue menor a la determinada en las otras dos plantaciones que sí reciben aplicación de fungicida. Esto pudiera ser debido a que el patógeno presente en la zona rural no está sometido a presión de selección, ya que no recibe aplicación de fungicida y por tanto no acumula densidades elevadas de población, en contraste al patógeno presente en las plantaciones que está bajo presión de selección del fungicida. Otra posibilidad se relaciona con el hecho de que la cantidad de inóculo está influenciado por la cantidad de plantas que actúan como hospederos de *M. fijiensis*. En la zona rural existen una variedad de plantas que no son hospederos y las pocas plantas de banano se encuentran dispersas unas de otras, y esto puede ser la razón de que la cantidad de inóculo del patógeno fuera menor; en cambio en las Plantaciones de manejo semi intensivo e intensivo de fungicidas, sólo existen monocultivo de plantas de banano y en gran número; y esto pudiera explicar la mayor cantidad de inóculo en dichas áreas.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que desde la implementación de la metodología de muestreo, colecta de material vegetal, extracción del ADN_g utilizando el protocolo CTAB, así como la cuantificación de la biomasa de *M. fijiensis* por PCR en tiempo real fue exitosa dado que permitió realizar el análisis del efecto de los fungicidas en las diferentes plantaciones en estudio. Una parte fundamental para que esta metodología funcionara adecuadamente fue la extracción de ADN_g y en concentraciones suficientes para amplificar por PCR en tiempo real, el gen de la β -tubulina de *M. fijiensis*, lo que demuestra que el método usado tiene una alta eficiencia de extracción, además de que es adaptable a varios tipos de tejido, incluyendo hojas (Becker *et al.*, 1996). Diversos trabajos como son los reportados por Leisova *et al.*, 2006 y Zhang *et al.*, 2008, han utilizado dicho protocolo y la técnica de PCR en tiempo real para el estudio de cuantificación de fitopatógenos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los muestreos de los años 2010 y 2011, y al hecho de que en cada año no se observaron diferencias significativas de biomasa entre la

Plantación de manejo semi intensivo e intensivo en los diferentes momentos de la aplicación del fungicida, en el presente estudio es difícil establecer cuál de los tratamientos (manejo semi intensivo ó manejo intensivo) resulta mejor para el control de la Sigatoka negra en las plantaciones de Tabasco. Esta falta de diferencias puede ser atribuible a que en el muestreo del año 2011, la Plantación clasificada como de manejo intensivo estuvo controlada con un nuevo programa de aplicación de fungicida, el cual es muy parecido al denominado de manejo semi intensivo. Dicho cambio de régimen podría explicar la falta de diferencias entre los tratamientos de fungicida en ambas plantaciones (manejo semi intensivo e intensivo).

De acuerdo a los resultados obtenidos para la biomasa de *M. fijiensis* en la colecta del año 2011 es posible sugerir que la aplicación de un programa de manejo semi intensivo en donde solo apliquen fungicida de contacto junto con las prácticas culturales sería una estrategia adecuada para el control de *M. fijiensis* en Teapa, Tabasco. Esta propuesta se basa en el hecho de que la Plantación San Juanito clasificada como de manejo semi intensivo presentó un buen control de la enfermedad de la Sigatoka negra y en ella solo aplican fungicida de contacto; por otra parte, en la colecta del año 2011, la Plantación San Fernando clasificada como de manejo intensivo, por causas ajenas a este estudio fue manejada como una plantación con régimen semi intensivo de fungicida e igualmente, con dicho manejo también mostró una mejor sanidad y un buen control del inóculo. Si las plantaciones se manejan con régimen semi intensivo también se disminuiría la posibilidad de generar cepas resistentes; un fenómeno observado frecuentemente en los sitios donde solo aplican fungicidas de tipo sistémico.

CAPÍTULO III

BIBLIOGRAFÍA

- Arzanlou M., Waalwijk C., Guzmán M., W. Crous P., Carlier J. (2007). Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. *Phytopathology*, 97: 1112-1118.
- Becker M., Caldwell, Zachgo A. (1996). *Biotechnology: A Laboratory Course*. Second Edition. Academic press, 216.
- Bellaire Luc de Lapeyre, Fouré E.; Abadie C., Carlier J. (2010). Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *EDP Sciences*, 65(6): 327-342.
- Cañas-Gutiérrez G. P., Patiño L. F., Rodríguez-Arango E., Arango R. (2006). Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *Journal of Phytopathology*, 154: 403-409.
- Jácome L., Lepoivre P., Martín D., Ortiz R., Romero R., Escalant V. (2003). *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and Outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. INIBAP Montpellier, 107-110.
- Leisova L., Minarikova V., Kucera L., Ovesna J. (2006). Quantification of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 446-455.
- Martínez I., Villalta R., Soto E., Murillo R. y Guzmán M. (2011). Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo de banano. CORBANA (Corporación Bananera Nacional, CR.), Hoja Divulgativa n° 2.
- Orozco-Santos M., Farías-Larios J., Manzo-Sánchez G., Guzmán-González S. (2000). Black Sigatoka in Mexico. *INFOMUSA*, 10: 33-37.
- Pasberg-Gauhl C., Gauhl F., Jones D. (2000). Fungal disease of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak. Disease of banana, abaca and ensete, 37-44.

- Shishido M., Sato K., Yoshida N. (2009). PCR-based assays to detect and quantify *Phomopsis sclerotoides* in plants and soil. The Phytopathological Society of Japan and Springer, 76: 21-30.
- Zhang Y., Fan P., Zhang X., Chen C., Zhou M. (2008). Quantification of *Fusarium graminearum* in harvested grain by Real-Time Polymerase Chain Reaction to assess efficacies of fungicides on Fusarium Head Blight, deoxynivalenol contamination, and yield of winter wheat. *Phytopathology*, 99 (1): 95-100.
- Weising K., Kaemmer D., Eppelen J.T., Weigand F., Saxena M.C., Kahl G. (1991) DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligonucleotides. *Curr Genet.* 19: 483-489.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.1 CONCLUSIONES

- El uso combinado de dos curvas de calibración, una del logaritmo de las diferentes cantidades de ADN vs Ct y otra de diferentes cantidades de micelio vs cantidad de ADN de *M. fijiensis*, permitió calcular directamente la cantidad de biomasa del hongo en los tejidos analizados.
- El protocolo de extracción de ADN adaptado en el presente trabajo resultó adecuado para el análisis de biomasa de *M. fijiensis* en muestras de campo.
- Se logró un método de muestreo en campo que permite ver el efecto sobre la biomasa de *M. fijiensis* de la aplicación de fungicidas (muestras colectadas durante la aplicación mostraron menos biomasa del hongo respecto a las colectadas antes y después de la aplicación).
- Se observó más variación de biomasa de *M. fijiensis* entre cuadrantes de la misma Plantación respecto al resultado entre Plantaciones, lo cual sugiere que la aplicación del fungicida no es homogénea a pesar de ser aplicación aérea, ó que están ocurriendo centros de generación de cepas con susceptibilidad disminuida al químico, del cual luego pueden dispersarse al resto de la plantación.
- El cambio de programa de San Fernando de 15 aplicaciones anuales de sistémico a aplicaciones de contacto cada 9 días más 4 aplicaciones de sistémico acerca este manejo a un control semi intensivo. Los resultados del PCR en tiempo real confirman esto, pues la biomasa en esta finca fue similar a la detectada en San Juanito, de manejo semi intensivo.
- Los resultados obtenidos con el protocolo establecido apoyan que este método puede ser utilizado para determinar en el campo la pérdida de sensibilidad de *M. fijiensis* a los fungicidas aplicados.

4.2 PERSPECTIVAS

- Los resultados serán integrados y comparados con los datos de otros grupos de trabajo que también realizan investigación sobre el control de la Sigatoka negra, ya que la detección eficiente del patógeno en las plantas puede ser la base que determine los ajustes a los programas de control. En base a los resultados globales se implementarán sugerencias de trabajo, las cuales se informarán a los productores de banano con la intención de que efectúen un mejor manejo de control de la Sigatoka negra.
- Para afinar el método de muestreo y/o validar el establecido en el presente trabajo sería recomendable realizar muestreos más frecuentes a lo largo del año en las plantaciones para analizar a más detalle como es el comportamiento de la población de *M. fijiensis* en la interacción *M. fijiensis*-fungicidas-medio ambiente y determinar cómo los fungicidas y las condiciones climatológicas influyen en la biomasa de *M. fijiensis* en la plantación.
- También se podría implementar programas de vigilancia y aplicación de normas para el uso adecuado de los fungicidas.

CAPÍTULO IV

4.3 ANEXOS

Cuadro 1. Calidad y cantidad del ADN extraído de hojas de banano enfermas con Sigatoka negra, la colecta se realizó en 2010 en la Plantación San Juanito (RJ). **(A)** Antes de la aplicación del fungicida (AP), **(B)** Durante la aplicación del fungicida (DR) y **(C)** Después de la aplicación del fungicida (DA). Los números en romano indican los cuadrantes donde realizaron las colectas.

A

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/μl)
RJIAP	1.97	1.86	420.03
RJIIAP	1.94	1.76	36.26
RJIIIAP	1.94	1.78	199.03
RJIVAP	2.35	0.65	198.7
RJVAP	2.94	0.41	139.9

B

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/μl)
RJIDR	2.81	0.48	151.13
RJIIDR	2.04	1.11	74.36
RJIIIDR	1.89	1.37	99.96
RJIVDR	1.89	2.16	204.76
RJVDR	2.22	1.14	57.3

C

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/μl)
RJIDA	2.13	0.97	113.16
RJIIDA	2.19	0.87	139.2
RJIIIDA	1.94	1.33	79.45
RJIVDA	1.97	1.48	78.63
RJVDA	1.98	1.46	50.33

Cuadro 2. Calidad y cantidad del ADN extraído de hojas de banano enfermas con Sigatoka negra, colectadas en el año 2010 en la Plantación San Fernando (SF). (A) Antes de la aplicación del fungicida (AP), (B) Durante la aplicación del fungicida (DR) y (C) Después de la aplicación del fungicida (DA).

A			
Muestra	A₂₆₀	A₂₈₀	Concentración (ng/μl)
SFIAP	1.83	1.79	37.76
SFIAP	2.17	1.15	423.43
SFIIAP	2.27	0.75	160.46
SFIVAP	2.61	0.54	169.46
SFVAP	2.20	0.70	158.3

B			
Muestra	A₂₆₀	A₂₈₀	Concentración (ng/μl)
SFIDR	3.18	0.38	207.96
SFIIDR	2.17	0.59	102.96
SFIIIDR	1.92	1.90	55.16
SFIVDR	1.87	1.74	41.1
SFVDR	2.53	0.51	46.35

C			
Muestra	A₂₆₀	A₂₈₀	Concentración (ng/μl)
SFIDA	1.96	1.70	27.73
SFIIDA	1.99	1.50	43.73
SFIIIDA	1.87	1.94	20.93
SFIVDA	1.98	1.65	124.33
SFVDA	1.85	1.99	71.76

CAPÍTULO IV

Cuadro 3. Calidad y cantidad del ADN extraído de hojas de banano enfermas con Sigatoka negra, colectadas en los años 2010 y 2011 en la zona rural sin aplicación de fungicida (CSM) (San José Puyacatengo). (A) Colecta del año 2010 (B) Colecta del año 2011.

A

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/μl)
CSMI	1.94	1.54	118.66
CSMII	1.80	1.94	53.73

B

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/μl)
CSMI	2.06	1.14	272.7
CSMII	2.11	1.28	313.2
CSMIII	2.01	1.34	176.0
CSMIV	2.15	1.03	298.2

Cuadro 4. Calidad y cantidad del ADN extraído de hojas de banano enfermas con Sigatoka negra, colectadas en el año 2011 en la Plantación San Juanito (RJ). (A) Antes de la aplicación del fungicida (AP), (B) Durante la aplicación del fungicida (DR) y (C) Después de la aplicación del fungicida (DA).

A

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/ μl)
RJIAP	1.93	1.83	365.9
RJIIAP	2.00	1.17	256.0
RJIIIAP	2.07	1.06	148.6
RJIVAP	1.83	1.74	164.4
RJVAP	1.99	1.50	257.3

B

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/ μl)
RJIDR	2.04	0.92	87.0
RJIIDR	2.26	0.78	184.2
RJIIIDR	2.16	1.14	327.5
RJIVDR	2.00	1.62	187.2
RJVDR	2.13	1.21	266.2

C

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/ μl)
RJIDA	1.82	1.51	160.2
RJIIIDA	1.91	1.84	276.3
RJIIIDA	1.89	1.70	220.7
RJIVDA	1.88	1.87	201.6
RJVDA	2.07	1.27	228.6

CAPÍTULO IV

Cuadro 5. Calidad y cantidad del ADN extraído de hojas de banano enfermas con *Sigatoka negra*, colectadas en el año 2011 en la Plantación San Fernando (SF). (A) Antes de la aplicación del fungicida (AP), (B) Durante la aplicación del fungicida (DR) y, (C) Después de la aplicación del fungicida (DA).

A

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/μl)
SFIAP	1.82	1.67	166.3
SFIIAP	1.82	1.39	169.2
SFIIIAP	1.81	1.20	179.2
SFIVAP	1.90	1.23	163.4
SFVAP	1.90	1.20	189.0

B

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/μl)
SFIDR	1.95	1.76	111.2
SFIIDR	2.03	1.37	208.2
SFIIIDR	1.87	1.39	101.8
SFIVDR	2.51	0.63	359.8
SFVDR	2.08	1.14	274.9

C

Muestra	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Concentración (ng/μl)
SFIDA	1.87	1.26	173.5
SFIIDA	1.98	0.85	143.8
SFIIIDA	1.90	1.38	186.5
SFIVDA	1.96	1.57	188.7
SFVDA	1.95	1.36	181.0