

## Análisis del Polimorfismo de 21 Genotipos de *Musa spp.*, Mediante el Uso de Marcadores Microsatélites

C. Romero<sup>(1,2)</sup>, P. Chong, O. Ruiz<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral. Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador. caromero@espol.edu.ec<sup>(1,2)</sup>; pachong@espol.edu.ec<sup>(1)</sup>

<sup>(2)</sup> Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral. Apartado 09-01-5863. Guayaquil, Ecuador.

### Resumen

*Este estudio fue llevado a cabo en 21 accesiones de diferentes genotipos de Musa spp, procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) con el objetivo de determinar la relación entre diversidad genética y el nivel de resistencia a la infección del hongo Mycosphaerella fijiensis Moreletcausante de la Sigatoka negra. Se usaron un total de 20 marcadores microsatélites, 10 derivados del genoma de Musa acuminata y 10 derivados del genoma de Musa balbisiana. Diecinueve marcadores produjeron bandas definidas y generaron un total de 85 alelos, con un promedio de 5.1 alelos por iniciador. El promedio de diversidad genética de  $He = 0,719$  y el índice de fijación  $F_{ST} = 0,409$  demuestran que existe una muy alta diferenciación genética entre los 21 genotipos de Musa spp. El análisis del conglomerado jerárquico (ACJ) mostró que los genotipos susceptibles son genéticamente más cercanos a los genotipos tolerantes y los genotipos resistentes están genéticamente más alejados de los genotipos tolerantes y susceptibles.*

**Palabras clave:** *Musa spp, polimorfismo, marcadores microsatélites, diversidad genética, índice de fijación.*

### Abstract

*This study was conducted in 21 accessions of different genotypes of Musa spp., from the Worldwide Collection (INIBAP Transit Center, Catholic University of Leuven, Belgium) with the objective to determine the relationship between genetic diversity and the level of resistance to the fungus Mycosphaerella fijiensis Moreletcausing black Sigatoka infection. We used a total of 20 microsatellite markers, 10 derived from the genome of M. acuminata and 10 derived from the genome of M. balbisiana. Nineteen markers produced well defined bands and generated a total of 85 alleles, with an average of 5.1 alleles per primer. The average genetic diversity was 0,719 and fixation index  $F_{ST} = 0,409$ . These results show a very high genetic differentiation among the 21 genotypes of Musa spp. The hierarchical cluster analysis showed that susceptible genotypes are genetically closer to tolerant genotypes and resistant genotypes are genetically more distant that tolerant and susceptible genotypes.*

**Key words:** *Musa spp, polymorphism, microsatellite markers, genetic diversity, fixation index.*

## 1. Introducción

En el Ecuador existen aproximadamente 180.092 hectáreas (ha) de banano, ubicadas en la región Litoral o Costa, particularmente en las provincias de Los Ríos (50 419 ha), Guayas (44.646 ha) y El Oro (43.353 ha) [1]. Este sistema de producción es afectado por muchas plagas y enfermedades, entre ellas la más importante es la Sigatoka negra, cuyo agente causal es un hongo ascomiceto denominado *Mycosphaerella fijiensis* Morelet[2].

El impacto que este hongo ha causado, no solamente tiene importancia desde el punto de vista económico, sino también ambiental debido a la alta concentración de fungicidas sistémicos y protectantes que se utilizan en las plantaciones para su control. Los costos del control de la enfermedad pueden llegar a los USD 1000/ha, en las grandes plantaciones. Para los pequeños productores, el costo es mayor debido a los altos precios de la aplicación aérea [2, 3]. El control de la Sigatoka negra es uno de los grandes problemas que enfrenta el país. Actualmente, todas las zonas en las que se encuentran sembrados bananos y plátanos, presentan plantas infectadas con Sigatoka negra [Jiménez, comunicación personal]. El porcentaje de plantas infectadas varía según el tipo de control, del cultivo (convencional u orgánico) [4]. Por tal motivo es de vital importancia que trabajos de investigación estén encaminados a buscar nuevas estrategias de control [3]. Los diseños de control más prometedores están en el desarrollo de variedades resistentes, que sirvan como zonas tampón entre las áreas con diferente grado de infección. Sin embargo, ha sido difícil encontrar variedades resistentes y que sean de interés comercial [5].

El desarrollo de técnicas de marcadores moleculares constituye una herramienta de selección rápida, confiable y reproducible que acelera la selección de genotipos resistentes o tolerantes a una determinada enfermedad; consecuentemente permite el mejoramiento genético de los cultivos [6, 7, 8]. La tecnología de marcadores moleculares ya ha sido utilizada para caracterizar diversidad de hongos que atacan a cultivos de Musa [10]. Además, análisis a través del uso de microsatélites han detectado un alto nivel de polimorfismo entre poblaciones [11]. La aplicación de técnicas basadas en el uso de marcadores moleculares proporciona la única herramienta que es capaz de revelar el nivel de polimorfismo en una secuencia de ADN, además son adecuados para detectar variabilidad genética entre individuos y dentro de poblaciones [6].

Para determinar el nivel de polimorfismo de las muestras, se utilizó la técnica de identificación de microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs), estos marcadores moleculares son altamente polimórficos, multi – alélicos, codominantes y fáciles de amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [9]. Los microsatélites o SSRs, son secuencias de ADN, cuya unidad de repetición varía de 1 a 7 pares de bases (pb), se distribuyen de forma dispersa a lo largo de todos los cromosomas de los organismos eucariotes y procariotes [12]. Estas secuencias muestran altos niveles de variación genética según las diferencias que se produzcan en las unidades repetidas en tandem de un locus [13, 14].

Estos marcadores permiten visualizar diferencias tangibles entre las secuencias homólogas del ADN de los organismos. Esas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, recombinación desigual, inserciones o deleciones en regiones homólogas [15, 16]. Tales diferencias pueden ser detectadas en geles de poliacrilamida, donde migran diferentes distancias de acuerdo a su tamaño [17].

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que existe una muy alta diferenciación genética entre los 21 genotipos de *Musa* spp., que poseen distintos niveles de resistencia a la Sigatoka negra.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material Biológico

Un total de 21 plántulas de banano, correspondientes a 5 accesiones susceptibles (Niyarma Yik, Pisang Berlin, Gran Enano, GCTCV-215, GCTCV-119); 12 accesiones tolerantes (FHIA-01, FHIA-02, FHIA-03, FHIA-17, FHIA-18, FHIA-23, IRFA-905, IRFA-908, TMBx 5295-1, SH-3640, B-7925, CRBP 39) y 4 accesiones resistentes (Calcutta-4, Tuu Gia, Yangambi KM5, T6), procedentes de la Colección Mundial (Transit Center INIBAP, Universidad Católica de Leuven, Bélgica) fueron usadas en este estudio.

El ADN genómico de cada planta fue extraído usando una combinación de los protocolos de extracción de ADN descritos por DellaPorta, Aljanabi y Martínez [18, 19] y modificados por Santos [20]. El ADN fue cuantificado mediante geles de agarosa. Los marcadores microsatélites utilizados para este estudio fueron originalmente aislados y desarrollados a partir de

variedades diploides de *M. acuminata* [8] y variedades diploides de *M. balbisiana* [21]. Las muestras fueron amplificadas por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siguiendo las especificaciones descritas por Creste *et al.* [8] y Buhariwalla *et al.* [21]. Los productos de la PCR fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% y visualizados por tinción de plata.

La diversidad genética entre las accesiones fue estimada usando el programa Tools for Population Genetic Analyses [22]. El programa Popgen 32 fue usado para determinar la frecuencia alélica por loci, el promedio de alelos por iniciador y el promedio de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_E$ ). La diferenciación genética fue estimada usando el programa FSTAT 2.9.3. 2 [23].

### 3. Resultados y discusión

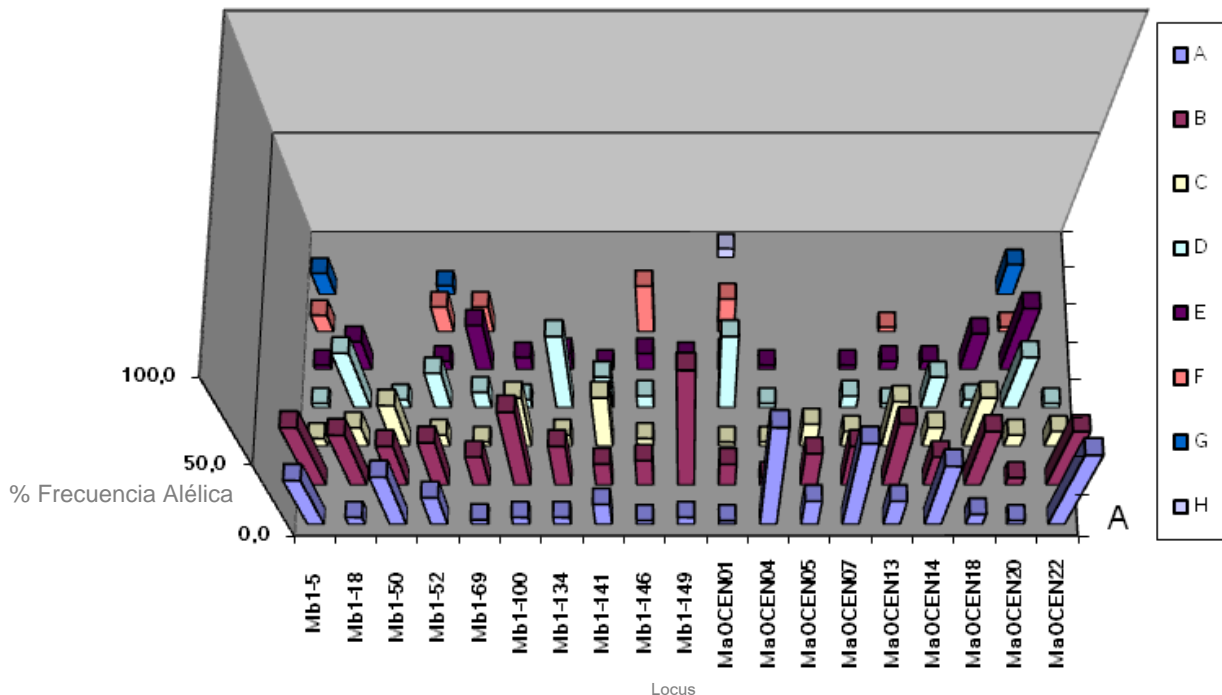
La mayoría de iniciadores produjo amplificaciones bien definidos, excepto el iniciador MaOCEN03 que no mostró amplificación en ninguna de las 21 accesiones de banano. Un total de 85 alelos fueron generados.

El número medio de alelos por iniciador fue de 5.1.

El locus MaOCEN01 fue el más polimórfico, con 8 alelos encontrados, el alelo más frecuente en este locus fue el de 242 pb, el cual presentó una frecuencia alélica del 42.9%. El alelo más frecuente en todas las poblaciones fue el alelo de 193 pb del locus Mb1-149, con una frecuencia alélica de 71,4%. El alelo de 200 pb del locus MaOCEN01, mostró la menor frecuencia alélica 2.3%. (Figura 1).

El iniciador MaOCEN05 presentó el menor contenido de información polimórfica (PIC por sus siglas en inglés), detectó solo un 37,5 % de polimorfismo, por lo que no se recomienda su uso para este tipo de estudios.

El promedio de diversidad genética fue de  $He = 0.7195$  y el promedio de heterocigosidad observada fue bastante alto  $Ho = 0.7393$ . Estos resultados apoyan similares observaciones realizadas por Oreiro [24] con respecto a la naturaleza altamente heterocigota del género *Musa*.



A, B, C, D, E, F, G, H: Alelos encontrados en la población.

**Figura 1.** Frecuencia alélica de los loci analizados en los 21 genotipos de *Musa* spp.

Los datos obtenidos en base al análisis con microsatélites indican que la mayoría de

genotipos de *Musa* tienen un exceso de heterocigosidad. Los valores negativos del

coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  (por sus siglas en inglés) en todos los locus (Tabla 1) indican muy bajos niveles de endogamia dentro de la población. Lo cual tiene concordancia con lo esperado, debido al origen diverso de los genotipos. Pappert [25], Auge [26] y Stilwell [27] han reportado que los clones de *Musa* (que son el resultado de hibridaciones intra e inter específicas) poseen altos niveles de heterocigocidad.

El valor promedio del índice de fijación ( $F_{ST}$ ) fue de 0,409. Wright [26] sugiere que valores superiores a 0.25 indican una muy alta diferenciación genética dentro de la población. En base a estos valores, podemos mencionar que existe una muy alta diferenciación genética dentro de la población. (Tabla 1). Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos por Ge *et al.* [28], quien utilizando marcadores microsatélites derivados de *M. balbisiana*, determinó valores de  $F_{ST}$  ubicados en el rango de 0.29 a 0.56 con un valor promedio de 0.43.

**Tabla 1.** Estructura genética de la población.

| Locus               | Tamaño de muestra | $F_{IT}$ | $F_{ST}$ | $F_{IS}$ |
|---------------------|-------------------|----------|----------|----------|
| Mb1-5               | 42                | -0,139   | 0,412    | -0,937   |
| Mb1-18              | 42                | -0,136   | 0,414    | -0,937   |
| Mb1-50              | 42                | -0,154   | 0,409    | -0,952   |
| Mb1-52              | 42                | -0,158   | 0,402    | -0,938   |
| Mb1-69              | 42                | -0,140   | 0,411    | -0,937   |
| Mb1-100             | 42                | -0,135   | 0,414    | -0,937   |
| Mb1-134             | 42                | -0,169   | 0,397    | -0,939   |
| Mb1-141             | 42                | -0,156   | 0,403    | -0,938   |
| Mb1-146             | 42                | -0,179   | 0,392    | -0,939   |
| Mb1-149             | 42                | -0,145   | 0,409    | -0,939   |
| MaOCEN01            | 42                | -0,156   | 0,403    | -0,938   |
| MaOCEN04            | 42                | -0,149   | 0,408    | -0,937   |
| MaOCEN05            | 42                | -0,151   | 0,413    | -0,962   |
| MaOCEN07            | 42                | -0,136   | 0,415    | -0,941   |
| MaOCEN13            | 42                | -0,149   | 0,408    | -0,942   |
| MaOCEN14            | 42                | -0,135   | 0,415    | -0,940   |
| MaOCEN18            | 42                | -0,144   | 0,411    | -0,940   |
| MaOCEN20            | 42                | -0,137   | 0,414    | -0,940   |
| MaOCEN22            | 42                | -0,133   | 0,417    | -0,944   |
| Media               | 42                | -0,147   | 0,409    | -0,941   |
| Desviación Estandar |                   | 0,052    | 0,028    | 0,026    |

$F_{IS}$ : Coeficiente de Endogamia

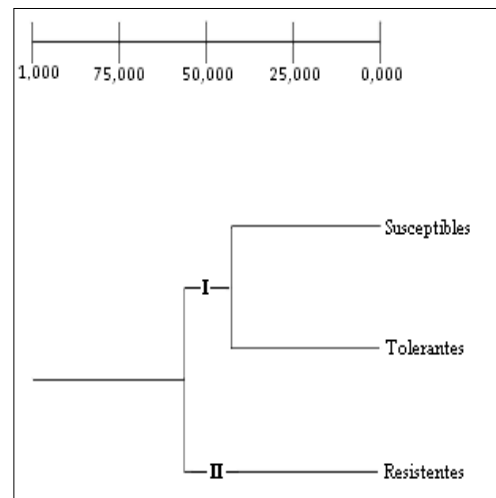
$F_{IT}$ : Índice de Fijación Total

$F_{ST}$ : Índice de Fijación

Para elaborar el dendograma, se agrupó a las accesiones de *Musa* spp., de acuerdo al nivel de resistencia que presentan hacia la infección del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet,

causante de la Sigatoka negra. La distancia genética entre los genotipos susceptibles y tolerantes es aproximadamente 30%. Los genotipos resistentes están 60% más alejados genéticamente de los genotipos susceptibles, y 30% más alejados de los genotipos tolerantes (Figura 2).

Los iniciadores utilizados en este estudio amplificaron secuencias de ADN (loci), que en el caso de los genotipos resistentes son altamente polimórficas, no así en los genotipos susceptibles. Estos resultados sugieren que, la diferenciación genética está correlacionada con el nivel de resistencia que presentan los genotipos.



**Figura 2.** Dendograma basado en Nei (1978). Distancia genética de los genotipos de *Musa* spp., según el nivel de resistencia a la Sigatoka negra.

Sin embargo, es necesario realizar estudios complementarios que nos permitan tener una mejor apreciación de la importancia que desempeña un alto nivel de diversidad genética en *Musa*.

Sería interesante complementar nuestro estudio realizando un análisis del polimorfismo del ADNcp (cloroplastos) a los 21 genotipos de *Musa* spp. Shepherd [28], Wong *et al.* [29] han reportado una significativa diferenciación genética en los cloroplastos usando marcadores moleculares AFLPs. Este estudio podría corroborar si efectivamente la diversidad genética está relacionada con el nivel de resistencia a la infección de *Mycosphaerella fijiensis*.

Es importante mencionar que el número de alelos encontrados en este estudio fue superior al número de alelos encontrados por Creste *et al.* [8] y Buhariwalla *et al.* [20]. Es posible que estas diferencias se deban a variaciones somaclonales, las cuales incluyen mutaciones puntuales,

duplicación genética, rearrreglo de cromosomas y cambios en el número de cromosomas. Ge *et al.* [28] consideran que este tipo de variaciones puede ocasionar mutaciones, especialmente a nivel de los microsatélites.

De comprobarse ésta hipótesis, los marcadores microsatélites utilizados ofrecerían una forma rápida de detección de variación somaclonal en plantas cultivadas *in vitro*. Esto permitiría aumentar la eficiencia en la producción de material vegetal para los productores bananeros, al ofrecer un producto en el que no se haya detectado este tipo de variaciones que afectan el normal desarrollo de la planta.

Debido a las limitaciones que posee *Musa* para emprender programas de mejoramiento genético (partenocarpia y esterilidad) [21], la única alternativa para encontrar nuevas variedades resistentes a la Sigatoka negra, es mediante la utilización de plantas cultivadas *in vitro*, a partir de explantes de flores masculinas inducidas a callos para establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de alto potencial de regeneración en plantas.

Por lo tanto, determinar la variabilidad genética de las principales variedades de banano cultivadas en el Ecuador, Gross Michel y Cavendish (que son utilizadas para extraer los explantes), en base al análisis del polimorfismo, podría incrementar la diversidad genética contribuyendo al mejoramiento genético de estos cultivos.

## 5. Conclusiones

Los altos valores del índice de fijación ( $F_{ST}$ ) demostraron que existe una muy alta diferenciación genética dentro de la población. El análisis del conglomerado jerárquico (ACJ) mostró que los genotipos susceptibles son genéticamente más cercanos a los genotipos tolerantes, y los genotipos resistentes están genéticamente más alejados de los genotipos susceptibles y tolerantes. Estos resultados sugieren que el nivel de resistencia hacia la infección de la Sigatoka negra de los genotipos de *Musa* spp., está relacionado con los valores de diferenciación genética que presentan.

## 6. Agradecimientos

Al personal del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por apoyarme en la realización de este trabajo, especialmente a la Doctora Esther Peralta, al M. Sc. Omar Ruiz y al Doctor Efren Santos. Quisiera agradecer también al Centro de Investigación

Científica y Tecnológica (CICYT) por financiar parte de esta investigación.

## 7. Referencias

- [1] Martínez, L. Trabajo Flexible en las Nuevas Zonas Bananeras del Ecuador. Red de Bibliotecas Virtuales de Ciencias Sociales de América Latina y el Caribe, de la Red de Centros Miembros de CLACSO, 2004.
- [2] Chang, J. Efectos de la dolarización en el costo de producción de banano en el Ecuador. ACROBAT – Ecuador, 2000, pp. 6.
- [3] Chong, P., Rodríguez H. Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet Provenientes de Haciendas Bananeras con Manejo Orgánico y Convencional. Revista Tecnológica ESPOL. Vol. 20, N° 1, 2007, pp. 215-222.
- [4] El cultivo del Banano. SICA. Servicio de Información y Censo Agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador Programa Nacional del Banano. Disponible en <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfilesproducto/banano.pdf>.
- [5] Crouch, J., and Vuylsteke, D. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa* spp.). EJB Electronic Journal of Biotechnology. Vol.1, N°1, 1998, pp. 11 – 22
- [6] Kresovich, S., Szewc-Mcfadden, A.K., Blick, S., McFerson JR. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). Theor. Appl. Genet, 1995, 91:206-211.
- [7] Carlier, J., Mourichon, X., González de León, D., Zapater, M.F. and Lebrun, M.H. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. Phytopathology, 1994, 84:751-756.
- [8] Creste, S., Benatti, T., Orsi, M., Risterucci, A., y Figueira, A. Isolation and characterization of microsatellite loci from a commercial cultivar of *Musa acuminata*. Molecular Ecology Notes 6. Brazil, 2006, pp. 303-306.
- [9] Crouch, J., Crouch, H., Constandt, H., Van Gysel, A., Breyne, P., Montagu, M.V., Jarret, R.L., Ortiz R. Comparison of PCR-based molecular marker analyses of *Musa* breeding populations. Mol Breeding, 1999, 5:233 – 244.
- [10] Johanson, A., and Jeger Johanson, A. and Jeger, M. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and *M.*

- musicola*, the causal agent of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. Mycological Research, 1993, 97:670-674.
- [11] Crouch, J., and Vuylsteke, D. Perspectives on the application of biotechnology to assist the genetic enhancement of plantain and banana (*Musa sp.*). EJB Electronic Journal of Biotechnology. Vol.1, No.1. Universidad Católica de Valparaíso -- Chile, 1998, pp 11 – 22.
- [12] Aljanabi, S. Martinez, I. Universal and rapid salt – extraction of high quality genomic DNA for PCR – based techniques. Nucleic Acids Research, 1997. pp, 4692 – 4693.
- [13] Tautz, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. N° 17, 1989, pp. 6463 – 6471.
- [14] Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11, 2002, pp. 1 – 16.
- [15] Strand y colaboradores. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. Nature, 1993, 365:274 – 276.
- [16] Yañez, V. Aislamiento y caracterización de marcadores moleculares microsatélites a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas*). Tesis de Grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú, 2002, pp. 15 – 24.
- [17] Rivera y Colaboradores. Isolation y caracterización of polymorphic microsatellites in *Coco nucifera*. Genome, 1999, 42:668 – 675.
- [18] Dellaporta, S. Word, J. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reports. N°1, 1983, pp. 19 – 21.
- [19] Aljanabi, S. Forget, L. Dookun, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. Plant Molecular Biology, 1999, Rep 17 1-8.
- [20] Santos, E. Characterization and isolation of T-DNA tagged banana promoters active during in vitro regeneration and low temperature stress. Dissertaciones de agricultura. Ph.D. thesis 787. Katholieke Universiteit Leuven, Belgium. Faculteit Bio-Ingenieurswetenschappen. 2008, 188 p.
- [21] Buhariwalla, H., Jarret, R., Jayashree, B., Crouch, J., and Ortiz, R. Isolation and characterization of microsatellite markers from *Musa balbisiana*. Molecular Ecology Notes 5. México, 2005, pp. 327-330.
- [22] Miller, M. Tools for populations genetic analyses (TFPGA) version 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997. Department of Biological Sciences. North Arizona University.
- [23] Goudet, J. Fstat. Versión 2.9.3.2. Institute of Ecology. Biology Building, 2002. UNIL. CH-1015, Lausanne, Switzerland.
- [24] Oreiro, C. Odunola, O. Lokko, Y. Ingelbretch, I. Analyses of B – genome derived simple sequences repeat SSR markes in *Musa spp.* African Journal of Biotechnology. Vol. 5, 2006, pp. 126 – 128.
- [25] Pappert, A. Hamrick, L. Donovan, L. Genetic variation in *Pueraria lobata* (Fabaceae), an introduced, clonal, invasive plant of the southeastern Unites States. American Journal of Botany, 2000, 87, 1240–1245.
- [26] Auge, H. Neuffer, B. Erlinghagen, F. Grupe, R. Brandl, R. Demographic and random amplified polymorphic DNA analyses reveal high levels of genetic diversity in a clonal violet. Molecular Ecology, 2001, 10, 1811–1819.
- [27] Stilwell, L. Wilbur, M. Werth, R. Taylor, R. Heterozygote advantage in the American chestnut, *Catanea dentata* (Fagaceae). American Journal of Botany, 2003, 90, 207–213.
- [28] Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution. 1965, 19: 395-420.
- [29] Ge, X. Liu, M. Wang, W. Schaal, B. Chiang, T. Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR – RFLP. Molecular Ecology, 2005, 14, 933 – 944.
- [30] Shepherd, K. Observation on *Musa* taxonomy. In: Identification of Genetic Diversity in the Genus *Musa*. Proceedings of International Workshop, Los Baños, Philippines. INIBAP, Montpellier, France, 1998, pp. 158–165.
- [31] Wong, C. Kiew, R. Loh, P. Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP. Annals of Botany, 2001, 88, 1017–1025.