

## Diversidad Genética de Poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* Provenientes de Haciendas Bananeras con Manejo Orgánico y Convencional

P. Chong<sup>(1,2)</sup>, H. Rodríguez von – Platen<sup>(1)</sup>

<sup>(1,2)</sup>Ing. Acuicultor, <sup>(1)</sup> Ph.D. Director CIBE-ESPOL

<sup>(1)</sup>Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador CIBE y

<sup>(2)</sup>Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Campus “Gustavo Galindo Velasco” La Prosperina Km. 30.5 vía Perimetral.

www.pachong@espol.edu.ec<sup>(1,2)</sup>

### Resumen

*El presente estudio esta enfocado en el análisis genético de diferentes poblaciones del hongo extraídas de plantaciones orgánicas y de plantaciones convencionales, contribuyendo a dar claves sobre la variabilidad genética de las poblaciones, su estructura y forma de dispersión y cómo una posible presión de selección podría cambiar la frecuencia de algunos alelos. Se encontró una pequeña cantidad de alelos por loci en promedio de 3.6 alelos. El alelo más común en el loci Mf061 tuvo una frecuencia de 0.95. Fis fue 0.86 mostrando un alto valor de endocria sugiriendo efecto fundador en estas poblaciones. La diferenciación entre las poblaciones de plantaciones orgánicas vs. plantaciones convencionales ( $F_{st} = 0.1439$ ), demostró muy baja diferenciación. Esto apoya la teoría de flujo genético a larga distancia en patógenos como *M. fijiensis*. Los altos valores indirectos de flujo genético  $Nm = 1.5$  confirman este hecho. Las poblaciones Orgánicas fueron cercanas a la población Salvaje. Poblaciones obtenidas de plantaciones convencionales fueron más distantes y fueron agrupadas en diferente cluster que las poblaciones orgánicas. Los resultados sugieren que existe un enorme flujo genético entre poblaciones. Las poblaciones de plantaciones convencionales fueron algo diferentes.*

**Palabras clave:** *Diversidad genética, flujo de genes, Mycosphaerella fijiensis*

### Abstract

*The present study is focused on the population genetics analysis of different populations of *M. fijiensis* extracted from organic and conventional banana plantations, contribute to give insights into the genetic variability of the populations, their structure and dispersion form and on how possible selection pressure could change the frequency of some alleles. Present analysis found that there was a small number of alleles per loci and an average of 3.6 alleles were found. The most common allele in loci Mf61 had a frequency of 0.95. Fis was 0.86 showed a high inbreeding value, suggesting a foundation effect in these populations. Differentiation among populations of organic plantations vs. the conventional plantations ( $F_{st} = 0.1439$ ), supporting very low differentiation. This will support the theory of long distance gene flow in pathogens as *M. fijiensis*. The high indirect measurement of gene flow  $Nm=1.5$  confirm this fact. Organic populations were closer to the wild population. Instead, populations obtained from conventional plantations were more distant and were grouped in different clusters with the organic populations. Combined results suggest that there is an enormous gene flow among populations. Populations from conventional plantations were slightly different.*

**Key Words:** *Genetic diversity, gene flow, Mycosphaerella fijiensis.*

## 1. Introducción

La Sigatoca negra es una de las enfermedades de mayor impacto económico para la producción de *Musa spp.* a escala mundial y en especial para el Ecuador como el mayor exportador de banano [1], siendo la causante de pérdidas de hasta el 30% en la producción en ausencia de fungicidas [2]. En el año 2001 se exportó banano por un monto de 827 millones de dólares equivalente al 18% del valor de las exportaciones totales de Ecuador. Las principales zonas de producción de banano en Ecuador son: El Oro y Los Ríos con el 31%, y el Guayas con el 30%, y en menor proporción Cañar, Esmeraldas y Cotopaxi. Alrededor del 0.6% del total de la superficie de Ecuador (147,282 ha) están bajo cultivo de banano.

En Ecuador, la mayoría de las áreas de producción no pertenece a las compañías multinacionales con extensas zonas de cultivo, sino a los pequeños hacendados con áreas tan pequeñas como 30 ha [3]. El costo total en fungicidas para el control de la Sigatoca negra se acerca a los USD 1000/ha, en las grandes plantaciones. Para los pequeños productores, el costo es mayor porque la aplicación aérea no es posible [4]. Consecuentemente, los controles químicos son caros y además peligrosos para el ambiente [5].

Los sistemas de control químico utilizados por los bananeros, no solo han producido impactos sociales y ambientales negativos, sino que están alterando las poblaciones del patógeno y su relación con el hospedero, transformando las poblaciones del hongo en patógenos cada vez más resistentes a los químicos. Por ejemplo, se tiene datos de que *M. fijiensis* se ha vuelto resistente a las estrobirulinas en Costa Rica en los últimos 5 años [6]. Siendo el control de la Sigatoca negra uno de los grandes problemas del País, los trabajos de investigación están dirigidos a buscar nuevas estrategias para de control. 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 [7]. Sin embargo, ha sido difícil encontrar variedades resistentes y de interés comercial. Por otro lado, se realizan trabajos para encontrar productos orgánicos que puedan controlar la enfermedad o al menos reducir su impacto en el campo.

El presente trabajo es una contribución al entendimiento de la distribución de la variabilidad genética y de la estructura de las poblaciones de *M. fijiensis* para establecer planes de manejo y de reducción de aplicación de pesticidas. En Ecuador falta información sobre las mayores fuentes de inóculo a nivel geográfico, sobre los factores que influyen a la recombinación genética de las poblaciones y el alcance de la influencia de una población en particular

a nivel geográfico sobre la estructura genética de las demás poblaciones del hongo.

## 2. Diversidad genética de *M. fijiensis*.

La estructura genética de *M. fijiensis* ha sido estudiada en los últimos años, estos trabajos han dado información en relación a la filogenia de la especie. Müller et al. [8] uso marcadores microsatélites para examinar 25 aislados de *M. fijiensis*, escogidas en micro y macro escalas geográficas de Nigeria. El trabajo de Rivas [9] encontró diversidad genética entre aislados de diferentes lesiones en una planta e incluso de la misma lesión en los diferentes lugares estudiados (poblaciones de África, Latinoamérica y el Caribe). Un alto nivel de diversidad genética y la presencia de poblaciones con cruzamiento al azar fue sugerida en el estudio global de Carlier et al. [10]. El trabajo de Rivas et al. [9] fue a una escala menor de el de Carlier et al. [10] en una sola plantación. Sin embargo, este trabajo, mostró el mismo alto nivel de diversidad genética, incluso a escala de una sola planta.

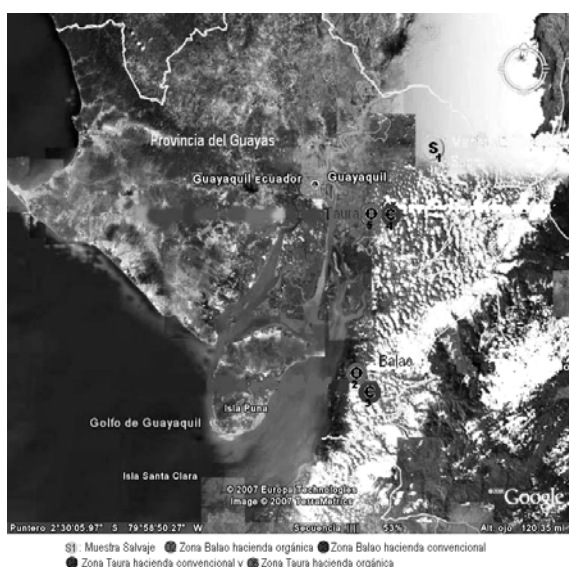
Carlier et al. [10] Examinaron la estructura genética global de las poblaciones de *M. fijiensis*, detectando un alto nivel de diferenciación de las poblaciones. La diversidad genética que encontró fue mayor en Papua Nueva Guinea y en las Filipinas. Carlier et al [10] propusieron que esa población fue parte del centro de origen de *M. fijiensis*. Las poblaciones de Sur América, África y Las Islas del Pacífico, tenían alelos en común con los de Papua y Filipinas pero su diversidad genética era mucho menor. Estos grupos son genéticamente homogéneos y específicos para cada una de estas regiones. Esto sugiere que la introducción de *M. fijiensis* a partir del sudeste asiático fueron limitadas e independientes unas de otras. Las poblaciones de América Latina muestran una mayor similitud con las de las islas del pacífico que con otras poblaciones [11]. Estos trabajos muestran que el conocimiento de la estructura genética de *M. fijiensis*, y la ocurrencia del flujo de genes, tiene una relevancia directa con los procedimientos de cuarentena y control [7].

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1 Situación Geográfica de la zona

Las muestras silvestres fueron obtenidas de la zona de Mariscal sucre provincia del Guayas. Dos de las haciendas de estudio fueron localizadas en la zona de Balao, una de ellas con control orgánico (S 2°50'16.90", W 79°45'03.80") y la otra con control convencional de la enfermedad (S 2°53'50", W 79°42'21"). Dos de las haciendas del estudio están

localizadas cerca del cantón Taura ( $2^{\circ}18'35.76''S$ ,  $79^{\circ}443'53.48''W$ ) en la provincia del Guayas al sur de la costa del Ecuador. La proximidad fue un factor importante para la comparación de los datos de estas dos haciendas, debido a su similitud en variables como: temperatura, precipitación, foto periodo y el viento, factores clave en el desarrollo del hongo [12]. La hacienda orgánica ( $S 2^{\circ}15'35.37'' W 79^{\circ}42'34.58''$ ) cubre un área de 223 ha. La hacienda Convencional, km 27 Vía el Triunfo tiene 87.5 ha bajo cultivo. La distancia física entre las haciendas de la zona de Balao es de 8,24Km aproximadamente. La distancia entre esta zona y el control es de 90km. La distancia entre las fincas situadas en la zona de Taura es de 7Km. y la distancia de la zona de Taura con el control es de 32,87Km.



**Figura 1.** Mapa de las zonas geográficas donde se tomaron las muestras.

### 3.2 Muestreo

El muestreo se realizó, recolectando de los focos de infección en las zonas seleccionadas. Se tomaron las muestras con una distribución de 5 plantas por Ha, recolectando la hoja 7 u 8, que presentan la infección en su etapa de reproducción, cuando las plantas de banano se encuentran cerca de la cosecha. Las muestras son mezcladas aleatoriamente y se procesan 25 discos de descarga. Luego de la descarga, se procede a seleccionar 5 cajas para recolección de las esporas. Se utilizaron 30 colonias monoascospóricas de *M. fijiensis*.

Se extrajo el ADN de las colonias adaptando el protocolo de extracción de J. Carlier [13], y se procedió a su amplificación en PCR con 10 primers específicos Mf005, Mf018, Mf025, Mf058, Mf06, Mf137, Mf145, Mf194, Mf203 y Mf244 [14], el programa de PCR es:  $94^{\circ}C$  por 4 min., 30 ciclos de:

$94^{\circ}C$  por 30 seg.,  $55^{\circ}C$  por 45 seg.,  $72^{\circ}C$  por 45 seg., extensión final de  $72^{\circ}C$  por 7 min., y  $4^{\circ}C$  indefinido (fin de la reacción) [14]. Para la reacción de PCR se utilizaron los reactivos de amplificación de la Taq polimerasa marca Invitrogen®.

El análisis estadístico de *Fis*, *F-Statistics* y *Gene Flow* (flujo genético) con los datos obtenidos se realizó por medio de los programas popgene32, Phylip 3.5 y Fstat293 disponibles en la Web:

[www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm](http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm)

[www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm](http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm)

## 4. Resultados y discusión

Las poblaciones estudiadas demostraron un alto nivel de homogeneidad, que se debe al alto porcentaje de alelos homocigotos en y entre las poblaciones. De los 10 loci estudiados, el locus Mf194 presentó la mayor cantidad de alelos 7 en total. Los locus que presentaron la menor cantidad de alelos fue el Mf203 con 2 alelos, y el promedio general de alelos fue de 3.6. Ninguna de los individuos tuvo el rango completo de todos los alelos encontrados.

Los loci utilizados para este estudio fueron originalmente aislados y desarrollados a partir de muestras de África y Norte América (Nigeria y México respectivamente) [14]. El alelo más frecuente en todas las poblaciones fue el alelo de 181pb del locus Mf025, con una frecuencia en las poblaciones de 0.9067 y el menos frecuente fue el alelo de 198pb del locus Mf061 con una frecuencia de 0.0036 en las poblaciones. Siete de los loci mostraron alelos únicos en diferentes poblaciones, algunos de ellos con frecuencias muy bajas en la población. Así tenemos que para el locus codificado Mf005 la población orgánica de la hacienda de la zona de Taura presenta 2 alelos únicos 202pb y 265pb con frecuencias en las poblaciones de 0.022, las más bajas en relación con el resto de poblaciones.

Para el locus Mf018 la población de la hacienda con control convencional de la zona de Taura presenta un único alelo de 120pb con la menor frecuencia en las poblaciones 0.045. El locus Mf025 presentó un alelo de 179pb en frecuencias muy bajas en ambas poblaciones de control convencional, pero totalmente ausentes en las poblaciones con control orgánico y en la población de control silvestre. A su vez un aislado heterocigoto de la población silvestre presenta un único alelo de 190pb inexistente en las demás poblaciones.

El locus Mf058 presentó un alelo único en la población Silvestre, también con la menor frecuencia 0.036. El locus Mf061 presentó un único alelo de 198pb en la población de la zona de Balao con control

convencional de la enfermedad con frecuencias de 0.017 la menos frecuente. En el caso del locus Mf137 un alelo con frecuencia 0.533 fue el más recuente y único en la población de la zona de Balao con control orgánico de la enfermedad. El locus más polimórfico fue el Mf194 con 7 alelos diferentes, de los cuales dos, el de 270pb y 292pb fueron únicos para la población de la zona de Balao con control convencional de la enfermedad, y se encontraban entre la frecuencia más alta de 0.400 y una de las frecuencias más bajas de 0.033 para dicha población, respectivamente.

Es interesante el hecho de que este locus posee un alelo de 280pb compartido entre una población de control orgánica de la zona de Balao y una de control convencional de la Zona de Taura, con frecuencias bajas de 0.033 y 0.019 respectivamente, único en estas dos poblaciones. Si bien este último alelo esta en muy bajas frecuencia muestra la influencia entre poblaciones, indicando posiblemente que la distancia geográfica entre ambas poblaciones no es lo suficientemente grande para evitar la recombinación sexual, o que existe intercambio de material contaminado entre ambas haciendas.

El locus Mf244 también mostró un alelo único de 203pb con una frecuencia baja de 0.043 en la población de control convencional en la zona de Taura. Tanto el Loci Mf018 como el Mf194 fueron los que mostraron la mayor cantidad de alelos heterocigotos en las poblaciones.

El índice de *Fst* que indica la estructura de las poblaciones fue en promedio 0,1439 (Tabla. 1), algo menor que el esperado para las poblaciones de Latinoamérica de 0,30 y de entre las poblaciones. Los libros de texto [15] consideran generalmente un valor *Fst* de 0,15 como un valor medio de diferencia y valores mayores a 0,25 valores muy altos de diferenciación genética entre las poblaciones.

**Tabla 1.** Sumario de F-Statistics y Gene Flow (flujo genético)

Locus	Sample Size	Fis	Fst	Nm*
Mf005	262	0.8993	0.1318	1.6471
Mf018	264	0.3928	0.0593	3.9658
Mf025	268	0.5456	0.0431	<b>5.5548</b>
Mf058	268	0.9606	0.1693	1.2262
Mf061	274	0.9131	0.1299	1.6751
Mf137	276	0.9356	0.1710	1.2120
Mf145	260	0.9478	0.0721	3.2194
Mf194	276	0.7210	0.1833	1.1140
Mf203	254	1.0000	0.2111	0.9342
Mf244	252	1.0000	0.2181	<b>0.8965</b>
Media	265	<b>0.8563</b>	<b>0.1439</b>	<b>1.4870</b>

\*calculo indirecto.

Sin embargo es necesario conocer experimentalmente las características genéticas de la especie en estudio, para poder establecer una escala de valor precisa para las poblaciones de cada especie. Los valores de heterocigosis observada promedio  $H_e$  de las poblaciones fue de 0.0484 mucho menor de lo esperado para las poblaciones de Latinoamérica de aproximadamente  $H_e$  0,40 y de África de 0,25 [7, 9], los valores de heterocigosis para cada población muestran que las poblaciones Convencionales tienen un valor de heterocigosis 0.0553 mayor que las poblaciones Orgánicas 0.0469 y Silvestre 0.0375.

Los valores de homocigosis fueron altos de 0.9516 y el Test estadístico de Hardy-Weinberg así mismo demuestran que los loci están en equilibrio genético, es decir que la probabilidad de cambios en las estructuras de las poblaciones al nivel de locus es muy baja. Si bien los loci esta en equilibrio, esto no quiere decir que no exista alguna mutación o que no se este dando algún tipo de selección, sino que estas pueden estar ocurriendo a tan baja frecuencia que no se detecta una desviación de las frecuencias genotípicas de los valores esperados.

Las poblaciones con control convencional de la enfermedad, en general mostraron más alelos únicos para esas poblaciones con relación a los encontrados en las poblaciones con controles orgánicos y con el control salvaje. En algunos de los locus en especial en el caso del número 8 uno de estos alelos únicos se encuentra en una de las frecuencias más altas en la población. Este dato es en particular interesante, y demuestra que este alelo es de gran influencia en esta población.

Se podría inferir, basado en el trabajo de Ware et al [16] en *M. graminicola* que estos pequeños cambios en las poblaciones con sistemas de control convencionales de la enfermedad, representan procesos individuales de mutación espontánea que podrían estar asociados a la resistencia a fungicidas. Sin embargo aunque el locus muestra un polimorfismo alto con relación a los demás loci, el test estadístico de Hardy-Weinberg demuestra que las diferencias en el locus no son significativas como para suponer que un cambio, es decir una mutación puntual en este locus, pueda afectar la frecuencia alélica actual.

No se puede concluir de forma definitiva que las diferencias se deban a la presión de selección basado en el tipo de control, es decir al uso de fungicidas, o si estas mutaciones puntuales, tienen algún efecto real sobre la expresión del fenotipo de las cepas de dicha población. Sin embargo la secuenciación de uno de estos alelos únicos que se encuentran en altas frecuencias posiblemente podrían mostrar cambios en la secuencia misma del alelo que podría a su vez ser correlacionada con una presión basada en fungicidas.

Este trabajo se ha realizado en otras especies como en *M. graminicola* [16]. Algunos individuos de la misma población mostraron genotipos idénticos, amplificando los mismos alelos de los 10 loci diferentes, esto y la alta tasa de individuos homocigotos podría explicarse, por el tipo de reproducción bipolar del hongo. La reproducción al azar respecto de un locus en común no es netamente universal, existen dos desviaciones de una reproducción completa al azar, una es si un individuo se recombinan con otro de forma no al azar por sus grados de parentesco con un ancestro común, es decir si en una población la recombinación entre individuos emparentados se encuentra en mayor proporción, que las combinaciones casuales (con individuos no emparentados), y la segunda que los individuos puedan de alguna forma escoger su pareja por la importancia de un característica en particular [15].

Los individuos homocigotos esperados en una reproducción al azar por ejemplo, corresponden más bien al producto de la frecuencia alélica entre los loci estudiados, y eso depende de las frecuencias de los alelos de cada locus y del número de loci estudiados [9]. Ahora bien la posibilidad de que en la reproducción sexual de *M. fijiensis* individuos muy emparentados (colonias hermanas o clones del mismo individuo) con los mismos alelos se crucen es aun desconocida. Se sabe que los procesos de cuello de botella locales (Bottle neck) y el efecto Fundador se da en *M. fijiensis* y estos fenómenos producen estructuras irregulares en las poblaciones [9], de manera que, es muy posible que en la naturaleza se den casos de recombinación de individuos emparentados aunque esto no ha sido estudiado aun.

Como en el caso de *M. graminicola* será interesante realizar estudios dirigidos a investigar los fenómenos de la reproducción en *M. fijiensis*. Tales como la influencia de la herencia materna, la recombinación entre cepas virulentas, avirulentas, resistentes y susceptibles a fungicidas con y sin presión de selección, así como la recombinación de cepas emparentadas y clones de la misma colonia.

Se debe recordar que los efectos fundadores pueden causar pérdida en la diversidad genética [17, 18, 19]. De hecho en el estudio del efecto Fundador hecho por Rivas et al [9] se encontraron niveles de diversidad genética muy bajos en algunas de las poblaciones de África, Latino América y el Caribe. Los diferentes niveles de diversidad genética a escala continental pueden deberse a procesos recientes de recolonización o de efecto fundador, que generan excesos en la diversidad de un gen en un loci neutral selectivo, en comparación con la diversidad genética esperada de un número observado de alelos bajo equilibrio de deriva mutacional [19]. En los trabajos de Rivas et al [9] se encontró considerable exceso en la diversidad de

algunos alelos en más de la mitad de las poblaciones estudiadas.

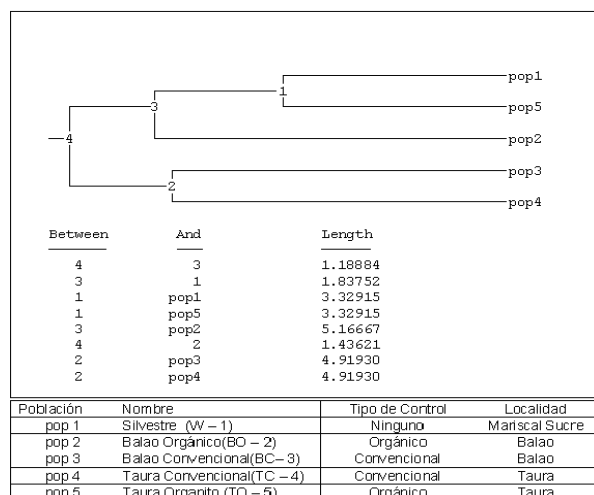
La baja diferenciación genética causada por el efecto fundador muestra indirectamente un gran porcentaje de recombinación genética es decir un flujo de genes muy alto entre las poblaciones. Al observar las medidas indirectas del  $Nm$  en la tabla 1 se aprecia que los valores de flujo genético de los diferentes alelos son ligeramente altos, siendo el valor de Mf025 uno de los mas altos con 5.5548, el mas bajo el valor del locus Mf244 fue de 0.8965 y el promedio de 1.4870, sin embargo es difícil precisar cuan significativos son los valores del  $Nm$  debido a que no existen parámetros definidos aun para la especie. Los valores altos del  $Fis$  0.8563 también son lo suficientemente altos en las poblaciones, como para sugerir un efecto fundador.

Esta alta tasa de recombinación de genes, puede deberse en parte a la cercanía geográfica de las fincas consideradas en el estudio de 8km aparte la una de la otra. Dado que la distancias no superan los 500Km. valor esperado de influencia de los procesos de distribución a larga distancia causado por el viento, valor mínimo en los caso de los ciclos de extinción - recolonización [20] es de esperar que exista influencia entre las poblaciones de todo el Ecuador.

Debido a este hecho es posible que la influencia de las poblaciones entre si a nivel local sea muy alto, debido a la dispersión de las esporas por el viento en toda la zona. Otra explicación es el movimiento de los materiales contaminados entre fincas. Por ejemplo, hojas de banana en los que se empaquetan racimos de segunda calidad y que se recogen por medio de camiones entre varias fincas.

Muchas de las fincas utilizan transportes comunes para el movimiento de los materiales de rechazo o de la fruta para el consumo local. Se debe acotar el hecho observado que muchos de estos transportes utilizan las hojas de banano como material de embalaje para el fruto de consumo local, esparciendo las esporas de *M. fijiensis* entre las plantaciones que recorren.

En el caso de estudio, el dendrograma de Nei (Figura 2) de distancias genéticas, muestra que existen, aunque muy pequeñas, diferencias entre las poblaciones, especialmente en lo relacionado con el tipo de control de la enfermedad utilizado. Las fincas orgánicas son genéticamente más cercanas a las poblaciones salvajes y las fincas convencionales mas alejadas del control silvestre. Esto podría demostrar la existencia de una presión de selección sobre las poblaciones del hongo causado por fungicidas en las fincas convencionales. La distancia física entre las haciendas de la zona de Balao es de 8,24Km aproximadamente y la distancia entre esta zona y el control es de 90km.



**Figura 2.** Dendrograma basado en Nei's(1972) Distancia genética: Método = UPGMA. -- Modificado por NEIGHBOR producido por PHYLIP Versión 3.5 --

La distancia entre las fincas situadas en la zona de Taura es de 7Km y la distancia de la zona de Taura con el control es de 32,87Km. Es interesante notar que la población mas alejada genéticamente del control es la población TC - 4 es decir la población con control convencional de la zona de Taura. Debido a que la distancia que existe entre estas poblaciones y el control no es la suficiente para evitar la recombinación, es de esperar que las poblaciones de la zona de Taura fueran las mas cercanas en sus estructuras genéticas de población al control, por la poca distancia física entre ellas, sin embargo como muestra el dendrograma (Figura. 2) las poblaciones bajo sistema de control orgánico son las mas parecidas al control a diferencia de las poblaciones bajo el sistema de control convencional. Esto muestra que el sistema de control ejerce presión sobre las poblaciones del patógeno.

Debido a la alta tasa de recombinación y flujo genético estas diferencias se diluyen entre las poblaciones manteniendo la frecuencia de los alelos naturales en equilibrio, de manera que las poblaciones de las fincas orgánicas y las poblaciones salvajes, actúan como una especie de tampón que reduce la distribución de nueva información genética, reduciendo la dispersión de posibles alelos mutantes de resistencia, esto si asumimos que la recombinación es totalmente al azar, y que las probabilidades de recombinación de cepas susceptibles y resistentes a la acción de fungicidas se debe en proporción de 1:1 en los diferentes aislados. Estudios en *Mycosphaerella graminicola* podrían mostrar que en la naturaleza esto no es del todo cierto.

Es importante resaltar el hecho que la resistencia a las nuevas moléculas antifúngicas esta aumentando a un ritmo acelerado. Entre las clases de fungicidas más recientes utilizados para el control de Sigatoca negra se encuentran las estrobirulinas. Trabajos en

*Mycosphaerella graminicola* han mostrado cómo la reproducción sexual ha contribuido a la fijación de la mutación en las poblaciones del hongo para darle resistencia a las estrobirulinas. Tal como *M. fijiensis*, *M. graminicola* es un hongo heterotálico con un sistema de reproducción de acoplamiento bipolar, donde las ascosporas juegan tal como en *M. fijiensis* un rol importantísimo en la dispersión del patógeno [21]. Como el sitio de enlace de las estrobirulinas es mayormente en la mitocondria, es lógico pensar que los alelos de resistencia a estos fungicidas se deben básicamente al aporte del tipo de acoplamiento materno, ya que este organelo en particular es de exclusiva herencia materna [22, 23].

Los trabajos en *Mycosphaerella graminicola* desarrollados por Ware et al [16] demostraron el importante papel de la reproducción sexual en la resistencia. En primer lugar se observo sorpresivamente que todos los cruces de las diferentes cepas en las semillas de trigo pretratadas con diferentes dosis de Amistar™ (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 y 200 % de azoxystrobin) obtuvieron descendencia, indicando que el azoxystrobin en una amplia variedad de dosis es incapaz de evitar la recombinación de las cepas Ware et al [16].

Los datos de Ware et al [16] demuestran que al parecer el estrés causado por las estrobirulinas estimula la preferencia de acoplamiento de las cepas resistentes del tipo materno del patógeno, de manera que las cepas sensibles al fungicida actúan como donadores paternos. Este hecho aceleraría la distribución de la resistencia después del evento inicial de mutación, que probablemente ocurre en una frecuencia muy alta. Este mecanismo podría ser responsable de la rápida dispersión de la resistencia a las estrobirulinas por *M. fijiensis* en Costa Rica [24, 25].

Otro dato interesante es que la influencia materna en las poblaciones en estado natural, esto es sin ninguna presión de selección debería ser normalmente en probabilidad de 1:1 ya que cada aislado paterno tiene la misma oportunidad de producir estructuras tanto femeninas como masculinas y el acoplamiento se supone que es un proceso al azar [26, 27]. Sin embargo en el trabajo de Ware et al [16] se observó que inclusive en las cepas utilizadas como control la inherencia materna no cumplía con la probabilidad de 1:1, indicando que la donación materna del material genético es realmente variable a través de los procesos de presión de selección, por aun no determinados factores ambientales e independientes del hospedero.

Lo cual significa que las poblaciones con el alelo mutante primero se comportan en la mayor parte de los casos durante el proceso de reproducción sexual como hembras heredando el alelo mutante de resistencia a toda la siguiente generación de ascosporas.

Segundo, independiente de los factores ambientales como temperatura, humedad y otros todavía no

estudiados, la población mutante es capaz de sobrevivir aun bajo la aplicación de fungicidas en forma tal que las poblaciones del hongo resistentes al fungicida permanecen dominantes en los monocultivos de banana [16]. Probablemente en el caso de *M. fijiensis* la posible resistencia al control que se da en el campo estará explicada por el mismo modelo de recombinación sexual.

Otro punto interesante, es el hecho que la mayoría de las variedades de *Musa* utilizadas en el campo son susceptibles a la enfermedad, estudios en *M. graminicola* han demostrado que aun en un hospedero resistente los genes de avirulencia de una cepa de *M. graminicola* no evitan la recombinación genética con una cepa virulenta a ese hospedero en particular [16], de manera que es de esperar que aun con la implementación en las haciendas bananeras de variedades tolerantes o resistentes a *Sigatoca negra* será difícil frenar la recombinación con cepas virulentas a esas variedades.

En el trabajo de Ware et al [16] los aislados avirulentos de *M. graminicola* en cultivares resistentes, no provocaron la hipersensibilidad [27], el efecto esperado de una interacción gen a gen [28], entre el gen de una cepa avirulenta de un patógeno y su correspondiente gen de resistencia de una variedad del hospedero resistente. Esto provocó que las cepas avirulentas produjeran suficiente biomasa como para lograr la recombinación sexual con las cepas resistentes del patógeno. Interesante en el caso de estas cepas avirulentas fue el hecho de su imposibilidad para reproducirse de manera asexual sobre los cultivares resistentes [16].

Dicho de esta manera en el caso de las especies de *Mycosphaerella*, lo más probable es que las estrategias de reproducción sexual, sean las más efectivas para la dispersión efectiva de alelos mutantes de resistencia y virulencia entre las cepas de las poblaciones. Si bien es cierto que la frecuencia alélica de las pequeñas variaciones encontradas en el presente estudio son en su mayoría muy bajas, cabe la posibilidad que las sucesivas generaciones del patógeno y la recombinación selectiva que podría darse en este caso, ayuden a la rápida dispersión de estos alelos mutantes que bien podrían ser los alelos de resistencia a fungicidas. El presente estudio de diferenciación genética de *M. fijiensis* es el inicio de la investigación de las poblaciones del resto del País, siendo el primer paso para el entendimiento de los procesos de dispersión de la enfermedad que ayudaran a determinar la necesidad de implementar medidas de cuarentena y a la planificación de mejores sistemas de control.

No es posible saber con certeza mediante la caracterización genética el flujo de un alelo mutante de linaje materno en particular, solo las diferencias entre

individuos de una población, su relación parental y la diferencia genética con relación a otras poblaciones. Será necesario considerar en el futuro el estudio particular de un modelo de recombinación sexual entre las cepas resistentes y susceptibles de *M. fijiensis* para dilucidar los mecanismos de resistencia del patógeno y la forma de distribución de la resistencia a fungicidas de la enfermedad en nuestro País. No hay certeza que dentro de las secuencias de microsatélites pueda existir mutaciones o cambios en un solo par de bases, por lo que para futuros estudios sería bueno secuenciar los fragmentos de ADN amplificados.

## 5. Conclusiones

Los pocos alelos encontrados por loci y la poca diferenciación genética a escala geográfica local demuestran la existencia del efecto fundador. Los valores altos de *F<sub>is</sub>* muestran un alto inbreeding en las poblaciones, y este hecho corrobora la existencia del efecto Fundador sobre las poblaciones del País reflejando la dispersión estocástica del patógeno en áreas tropicales. La importancia relativa de las formas de dispersión no pudo ser determinada.

Los valores de *F<sub>st</sub>* demostraron que existe una diferenciación moderada entre las poblaciones de haciendas Orgánicas vs haciendas de control Convencional, esto sugiere la existencia de la presión diferencial ejercida por el tipo de control aplicado. Los altos valores de *N<sub>m</sub>* muestran posiblemente la dominancia que ejercen algunos alelos sobre otros. Posiblemente los alelos dominantes se relacionen con la presión de selección del control con fungicidas.

Las poblaciones Orgánicas son genéticamente más cercanas a la población Silvestre que la distancia de las poblaciones Convencionales con las Silvestres. Este resultado sugiere que la presión de los químicos y en este caso de las estrobirulinas las más utilizadas, podrían de alguna manera estar contribuyendo a la divergencia de las poblaciones Convencionales vs las Silvestres.

## 6. Referencias

- [1] FAO Accessed on the Internet at –2000 <http://www.inibap.org/network/tabexpor.html>
- [2] Mobambo K. N., Gauhl F., Vuylsteke D., Ortiz R., Pasberg – Gauhl C. And R Swennen.. Yield loss in plantain from black Sigatoca leaf spot and fieldperformance of resistant hybrids. Filed Crops Res. 35, 1993. pp 35 – 42.
- [3] SICA, Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Base de datos del III Censo Nacional Agropecuario. 2004. [on line]. Disponible en <http://cna.sica.gov.ec/listado.htm> [accessed on 1/04/2005].

- [4] Arias P., Dankers C., Liu P. and Pilkaus P.. The World banana economy. 1985 – 2002. Accessed on the internet <http://www.fao.org/> 2003.
- [5] Roux., N, Toloza, A., Busogoro, J.P., Panis, B., Strosse, H., Lepoivre, P., Swennen, R. and Zapata-Arias, F.J. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. In: *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the workshop on *Mucosphaerella* leaf spot diseases held in San Jose, Costa Rica on 20-23 May 2002.
- [6] Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S, Gisi U.. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc<sub>1</sub> enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. Pest Management Science 2000a, 56: 833 – 841.
- [7] Hayden H. L., Carlier J. and Aitken E. A. B. “Genetic structure of *Mycosphaerella fijiensis* populations from Australia, Papua New Guinea and the Pacific Islands” Plant Pathology 2003. Vol. 52, Issue 6, Page 703-712.
- [8] Müller R, Pasberg – Gauhl C, Gauhl F, Ramser J, Kahl G.. “Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigeria *Mycosphaerella fijiensis*”. Journal of Phytopathology (1997) 145, 25 – 30.
- [9] Rivas G., Zapater M., Abadie C. and Carlier J. “Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of banana *Mycosphaerella fijiensis*”. Molecular Ecology 2004. Vol 13, Issue 2, Pág. 471.
- [10] Carlier, J., Lebrun, M.H. Zapater, M.F., Dubois, C. and Mourichon, X. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus *Mycosphaerella fijiensis*. Molecular Ecology 1996. Chapter 5, 499-510
- [11] Pérez, Luis. Manual para el manejo integrado de Sigatoka negra y Sigatoka amarilla en banano y plátano. Provento TCP/CUB/4454. 27pp 1996
- [12] Gauhl, F. Epidemiología y Ecología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET) en plátano (*MUSA sp.*), en Costa Rica. Editado por INIBAP. (1994) 120 pp.
- [13] Carlier J. Tesis: “Estudio de la estructura de las poblaciones, por RFLP, de *Mycosphaerella fijiensis*, agente responsable de la enfermedad de la raya negra del Banano” Universidad de PARIS-SUD Centre D’ORSAY, Julio 1994.
- [14] Neu C., Kaemmer D., Kahll G., Fischer D. & Weising K. “Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*”. Blackwell Science Ltd, Molecular Ecology, 8, (1999) 513 – 525
- [15] Griffiths A., Millar J. H., Suzuki D. T., Lewontin R. C., Gelbart W. M., “An Introduction to Genetic Analysis” Sixth edition W.H. FREEMAN AND COMPANY NEW YORK 1996. Chapter 1: 14; 26 : 792,793, 791 – 799.
- [16] Ware S, Díaz – Trujillo C, Kema G, van der Lee T, de Waard M.. 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, 2006. ISBN 90-8504-527-4 Chapter 2: 34, Chapter 5: 102 – 104; 114 – 119.
- [17] Stover R. H., Simmonds N. W. Bananas (Longman, London, ed 3) 1987
- [18] Nei M, Maruyama T, Chakraborty R.. The bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution, (1975) 29, 1 – 10.
- [19] Maruyama T, Fuerst PA.. Population bottlenecks and non-equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by recent bottleneck. Genetics, (1985) 111, 675 – 689.
- [20] Brown J, Hovmøller M. Aerial Dispersal of Pathogens on the Global and Continental Scales and Its Impact on PLant Disease. Science, 2002. Vol. 297 Issue 5581, p537, 5p, 3 maps.
- [21] Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics, (1996). 144, 2001 – 2014.
- [22] Birky CW. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes-mechanisms and evolution. Proceedings of the National Academy of Science. USA (1995). 92: 11331 – 11338
- [23] Russell PJ.. Genetics. Harper Collins College Publishers, New York. 1996.
- [24] Kninght S, Wirz M, Amil A, Cook A. Fungicide resistance in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet: Current status and outlook. ACORBAT proceedings. 2002.
- [25] Marín D, Romero R, Guzman M, Sutton TB. Black Sigatoca: An increasing treta to banana cultivation. Plant disease (2003) 87: 208 – 222.
- [26] Coenen A, Croft JH, Slakhorst M, Debets F, Hoekstra R. Mitochondrial inheritance in *Aspergillus nidulans*. Genetic Research (1996). 67: 93 – 100.
- [27] Robinson HL, Ridout CJ, Sierotzki H, Gisi U, Brown JKM. Isogamous, hermaphroditic inheritance of mitochondrion-encoded resistance to Qo inhibitor fungicides in *Blumeria graminis f. sp. Tritici*. Fungal Genetics and Biology (2002). 36: 98 – 106
- [28] Van der Biezen EA, Jones DG. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. Trends in – Biochemical Science (1998) 23: 454 – 456.