

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Identificación microscópica y molecular de hongos  
asociados a *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka Negra) en  
banano**

Proyecto de Investigación

**Amir Sebastián Abedrabbo Campana**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 17 de mayo de 2017

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Identificación microscópica y molecular de hongos asociados a  
*Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka negra) en banano**

**AMIR SEBASTIÁN ABEDRABBO CAMPANA**

Calificación:

Nombre del profesor, título académico

Antonio León, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 17 de mayo de 2017

## **Derechos de Autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Amir Sebastián Abedrabbo Campana

Código:

00104424

Cédula de Identidad:

1716360761

Lugar y fecha:

Quito, mayo de 2017

## **Dedicatoria**

La presente tesis se la dedico a toda mi familia por su apoyo para que pueda concluir mis estudios.

A mis padres por su esfuerzo y confianza en todo lo necesario para poder cumplir mis objetivos.

A Manira por su amor y por estar siempre presente.

A todas las personas que han sido parte de este proceso y fuente de inspiración para poder acabar la universidad.

## **Agradecimientos**

Quiero brindar un efusivo agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a concluir la carrera. A Dario y Noelia, por su conocimiento y sabiduría. A Karen, por su constante ayuda. A Fernando y Gabriela por su confianza, amistad y excelente disposición para ayudarme a cumplir mis objetivos.

A mi director de tesis, Antonio León, por sus consejos, sabiduría, enseñanzas y ayuda para la realización de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que de una u otra manera estuvieron presentes en este trabajo con sus buenas energías, sonrisas, apoyo e inspiración.

## Resumen

La Sigatoka Negra es una enfermedad devastadora que puede ocasionar millones en pérdidas de plantaciones enteras. Dentro del Ecuador, el sector bananero ocupa un rubro muy importante, siendo el segundo de mayor exportación. Además, representa el 50% del PIB agrícola del país. Es por esto que las lesiones ocasionadas por la Sigatoka Negra producen efectos adversos muy severos en el país. Esta enfermedad ocurre principalmente por la presencia del hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Sin embargo, dentro de este trabajo se encontró la presencia de 3 hongos más dentro de las heridas foliares del banano. Estos hongos son: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium equiseti* y *Nigrospora oryzae*. Estas identidades fueron comprobadas a través del aislamiento y secuenciación de regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S. Si bien existen varios reportes que indican la patogenicidad de estos hongos, como por ejemplo la antracnosis ocasionada por *Colletotrichum gloeosporioides*, han sido descritos como endófitos para el banano. Una vez que se obtuvieron las identidades de los aislados, por género y especie, se realizaron análisis de filogenia para comprobar la similitud de las secuencias con las que se encuentran disponibles en la base de datos del NCBI.

**Palabras clave:** Patogenicidad, endófitos, regiones ITS, análisis de filogenia, NCBI.

## Abstract

Black Sigatoka is a devastating disease that can cause millions in losses of entire plantations. Within Ecuador, the banana sector occupies a very important area, being the second largest product of exportation. In addition, it accounts for 50% of the country's agricultural GDP. That is why the injuries caused by Black Sigatoka produce very severe adverse effects in the country. This disease occurs mainly because of the presence of the fungus *Mycosphaerella fijiensis*. However, in this work the presence of 3 more fungi within the foliar wounds of the banana were found. These fungi are: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium equiseti* and *Nigrospora oryzae*. These identities were verified through the isolation and sequencing of ITS regions of 5.8S ribosomal DNA. Although there are several reports indicating the pathogenicity of these fungi, such as anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, they have been described as endophytes for bananas. Once the identities of the isolates were obtained, by genus and species, phylogeny analyzes were performed to verify the similarity of the sequences with those available in the NCBI database.

Key words: Pathogenicity, endophytes, ITS regions, phylogeny analyzes, NCBI.

## Tabla de contenido

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>11</b> |
| 1.1      | BOTÁNICA DEL BANANO .....   | 11        |
| 1.2      | IMPORTANCIA DEL BANANO EN EL ECUADOR .....  | 11        |
| 1.3      | ENFERMEDADES EN BANANO .....  | 12        |
| 1.3.1    | <i>Sigatoka negra</i> .....   | 12        |
| 1.3.2    | <i>Mal de Panamá</i> .....  | 13        |
| 1.3.3    | <i>Otras enfermedades</i> .....   | 14        |
| 1.4      | DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES .....   | 15        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>   | <b>17</b> |
| 2.1      | OBJETIVO GENERAL.....   | 17        |
| 2.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 17        |
| <b>3</b> | <b>JUSTIFICACIÓN .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>4</b> | <b>ÁREA DE ESTUDIO.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>5</b> | <b>MATERIALES.....</b>  | <b>20</b> |
| 5.1      | PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO .....  | 20        |
| 5.2      | SUBCULTIVO DE HONGOS EN MEDIO PDA .....   | 20        |
| 5.3      | IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS .....   | 20        |
| 5.4      | EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE HONGOS .....  | 21        |
| 5.5      | AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES ITS DEL ADN RIBOSOMAL 5.8S MEDIANTE LA<br>TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)..... | 21        |
| 5.6      | PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DE LAS REGIONES ITS DEL ADN RIBOSOMAL<br>5.8S AMPLIFICADAS.....                                  | 22        |
| 5.7      | IDENTIFICACIÓN EN BASE A LAS SECUENCIAS DE LA REGION ITS DEL ADN RIBOSOMAL<br>5.8S AMPLIFICADAS.....                              | 22        |
| 5.8      | ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HONGOS .....   | 22        |
| <b>6</b> | <b>MÉTODOS .....</b>  | <b>23</b> |
| 6.1      | PREPARACIÓN DE MEDIOS .....   | 23        |
| 6.2      | SUBCULTIVO DE HONGOS EN MEDIO PDA .....   | 23        |
| 6.3      | IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS .....   | 23        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 6.4       | EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE HONGOS .....  | 24        |
| 6.5       | AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES ITS DEL ADN RIBOSOMAL 5.8S MEDIANTE LA<br>TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)..... | 25        |
| 6.6       | PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR, SECUENCIAMIENTO DE LA REGION ITS DEL<br>ADN RIBOSOMAL E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS.....       | 25        |
| 6.7       | ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HONGOS .....   | 26        |
| <b>7</b>  | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>27</b> |
| 7.1       | AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS .....  | 27        |
| 7.2       | CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS HONGOS .....   | 27        |
| 7.3       | ANÁLISIS Y SECUENCIACIÓN DE LA REGION ITS DEL ADN RIBOSOMAL.....  | 27        |
| 7.4       | ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HONGOS .....   | 28        |
| <b>8</b>  | <b>DISCUSIÓN .....</b>  | <b>29</b> |
| 8.1       | ANÁLISIS, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS .....  | 29        |
| 8.2       | ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE HONGOS .....   | 31        |
| <b>9</b>  | <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>10</b> | <b>RECOMENDACIONES .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>11</b> | <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>12</b> | <b>FIGURAS.....</b>   | <b>41</b> |
| <b>13</b> | <b>TABLAS.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>14</b> | <b>ANEXOS.....</b>  | <b>51</b> |
| 14.1      | ANEXO A: METODOLOGÍA DE LA PURIFICACIÓN DE LAS REGIONES ITS DEL ADN<br>RIBOSOMAL 5.8S AMPLIFICADAS.....                           | 51        |

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>FIGURA 1:</b> IDENTIFICACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS <i>COLLECTOTRICUM</i> SP, <i>NIGROSPORA</i> SP, <i>FUSARIUM</i> SP, <i>MYCOSPHAERELLA</i> SP   | 41 |
| <b>FIGURA 2:</b> GEL DE AGAROSA AL 2% DONDE SE VISUALIZAN LAS MUESTRAS. LADDER (1000PB). A1: <i>COLLECTOTRICHUM</i> . A2: <i>NIGROSPORA</i> . A3: <i>FUSARIUM</i> . A4: <i>MYCOSPHAERELLA</i> . C-:BLANCO. | 42 |
| <b>FIGURA 3:</b> FRAGMENTO DE UN ELECTROFEROGRAMA DE LA REGIÓN ITS4 DEL ADN RIBOSOMAL 5.8S DE <i>MYCOSPHAERELLA</i> DESDE 370PB HASTA 470PB.   | 42 |
| <b>FIGURA 4:</b> ARBOL FILOGENÉTICO DE INFERENCIA BAYESIANA. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN ITS DE <i>COLLECTOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES</i> .  | 43 |
| <b>FIGURA 5:</b> ARBOL FILOGENÉTICO DE INFERENCIA BAYESIANA. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN ITS DE <i>NIGROSPORA ORYZAE</i> .  | 44 |
| <b>FIGURA 6:</b> ARBOL FILOGENÉTICO DE INFERENCIA BAYESIANA. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN ITS DE <i>FUSARIUM EQUISETI</i> .  | 45 |
| <b>FIGURA 7:</b> ARBOL FILOGENÉTICO DE INFERENCIA BAYESIANA. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA REGIÓN ITS DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS</i> .   | 46 |

## Índice de Tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>TABLA 1:</b> CANTIDAD DE REACTIVOS UTILIZADOS PARA UNA REACCIÓN DE PCR DE LA REGIO ITS DEL ADN RIBOSOMAL.                                       | 47 |
| <b>TABLA 2:</b> TIEMPO UTILIZADOS EN EL PROGRAMA DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGION ITS.  | 47 |
| <b>TABLA 3:</b> IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS AISLADOS CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PLATAFORMA BLAST PARA LAS SECUENCIAS DE LA REGIÓN ITS. | 47 |
| <b>TABLA 4:</b> REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE HONGOS AISLADOS  | 48 |

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Botánica del Banano

El banano, *Musa paradisiaca*, es una planta cuyo origen son las zonas tropicales del Asia. Su tamaño puede oscilar entre los 3 y 7 metros de altura. Es una planta herbácea perenne y un racimo puede tener de entre 100 a 400 frutos según su variedad (PROECUADOR, 2016).

El banano es una fruta rica en diversas vitaminas, dentro de las cuales se destacan la vitamina A, B, C y minerales como el potasio y el magnesio. El banano es una planta que es capaz de crecer en una amplia variedad de condiciones climáticas, incluyendo tipos de suelo. El crecimiento ideal del banano se da a una temperatura de 18.5°C. El banano es capaz de vivir y crecer durante cualquier época del año. El cultivo de esta planta alrededor del mundo asciende a más de 150 países (PROECUADOR, 2016).

### 1.2 Importancia del banano en el Ecuador

Dentro del Ecuador, el banano es una fruta de mucha importancia. La zona de cultivo llega alrededor de 230,000 ha dentro del país, que se encuentran principalmente distribuidas en las provincias del Guayas, Los Ríos y el Oro, ocupando cerca del 92% de la producción total del país (INIAP, 2010). La importancia económica de esta planta se ve reflejada en su representación dentro del PIB agrícola, que asciende hasta el 50% (INIAP, 2010).

Esta planta tiene una gran importancia en el campo económico del país. Dentro del PIB total, las exportaciones de banano representan aproximadamente el 4%, alcanzando \$1017 millones. En el 2015, cerca del 50% de las exportaciones de banano del Ecuador fueron a países como Rusia, Estados Unidos y Alemania. Se estima que es tanta la importancia del banano que toda su actividad y su cadena de valor genera aproximadamente trabajo para 2 millones de personas (PROECUADOR, 2016).

Al ser un cultivo perenne que se produce de manera extensiva (monocultivo), existen diversos problemas bióticos y abióticos que merman su producción. En algunas ocasiones, las enfermedades pueden provocar la pérdida del 100% de la producción. (Fabre, 2015)

### **1.3 Enfermedades en Banano**

Existen varias enfermedades que causan daños en los cultivos de banano. Los efectos de las enfermedades pueden ser tan devastadores que en ocasiones hacen que se pierdan cultivos completos. Durante los últimos años, existe una enfermedad que se ha destacado frente a las otras, debido a la magnitud del daño que puede provocar plantaciones del banano.

#### **1.3.1 Sigatoka negra**

Se ha logrado identificar el patógeno que es capaz de producir esta enfermedad, *Mycosphaerella fijiensis* o *Cercospora fijiensis*. Estos dos nombres corresponden al mismo hongo pero en diferentes etapas de su ciclo de vida. Los conidios son esporas asexuales que se encuentran presente dentro de la primera fase de la enfermedad. La fase asexual del hongo recibe el nombre de *Cercospora fijiensis* (Bornacelly, 2009)

Por otro lado, las ascosporas son las esporas de origen sexual que se encuentran presentes una vez que la enfermedad ha avanzado y las hojas se encuentran en estado necrótico, el hongo en la fase sexual recibe el nombre de *Mycosphaerella fijiensis* (Bornacelly, 2009).

La Sigatoka negra es la enfermedad más destructiva del follaje de banano y se encuentra distribuida en casi todo el mundo. Esta enfermedad se caracteriza por causar manchas foliares y provocar infecciones masales, lo que ocasiona la madurez temprana del fruto, lo que a su vez disminuye la producción de la fruta en un 38%. (Manzo-Sánchez. *et. al*, 2007).

El progreso o avance de la enfermedad se encuentra relacionado a las condiciones climáticas, manejo del cultivo y el tipo de variedad cultivada. Según la escala de Fouré, existen 6 estadios propios de esta enfermedad. En el estado 1, se logra observar lesiones pequeñas que son apenas visibles en el envés de la hoja. En el estado 2, se logra observar rayas de color marrón de 4 mm de longitud. Dentro del estado 3 de la enfermedad, las rayas de color marrón se tornan más cafés y su longitud aumenta hasta los 2 cm. En el estado 4, ya aparecen manchas ovaladas de color café en el envés y de color negro en el haz de la hoja. En el estado 5, se observa un halo amarillo alrededor de las manchas negras y finalmente en el estado 6, ya se ven manchas profundas y de gran tamaño de color marrón claro (Álvarez, 2013).

Según datos de la asociación de exportadores bananeros del Ecuador, la producción de banano del 2011 al 2012 cayó en un 13% debido a la Sigatoka negra. Se tiene un estimado que la Sigatoka negra afecta anualmente un 30% la producción bananera del país. Estos datos demuestran que esta afección es una de las más considerables en lo que se refiere a cultivos en el país (INEC, 2013).

El control de esta enfermedad principalmente consiste en el uso de fungicidas protectantes y sistemáticos. Estos fungicidas son de aplicación aérea y tienen diversos mecanismos de acción frente a este patógeno. Una rotación adecuada de estos fungicidas controla la enfermedad y previene la adaptabilidad de mismo frente a los agentes químicos. El uso de estos fungicidas genera un 30 a 40% de incremento en el costo de la producción (Martínez, *et. al*, 2011). Si bien la Sigatoka negra es una enfermedad con una importancia significativa en la actualidad, no es la única.

### **1.3.2 Mal de Panamá**

El mal de Panamá se encuentra asociado *Fusarium* sp. Esta enfermedad es considerada mundialmente como la enfermedad más devastadora para el banano. *Fusarium*

*oxysporum* fue registrado como causante de esta patología por primera vez en 1876 en Australia, y se estima que para 1950 casi ninguna región del planeta se encontraba libre de esta enfermedad (Sotomayor, 2012).

*Fusarium oxysporum*, es un patógeno responsable de ocasionar pérdidas millonarias en la región de Asia. La raza 4 de este hongo se caracteriza por ser una forma altamente virulenta con la capacidad de atacar a los cultivares de banano Cavendish, los cuales representan casi el 100% de la producción y exportación mundial (Sotomayor, 2012).

Los síntomas de esta enfermedad empiezan a manifestarse con el marchitamiento y amarillamiento uniforme de las hojas. El contorno de las hojas empieza a tomar un color marrón y posteriormente gris. Comienzan a aparecer manchas necróticas dentro de la hoja hasta que esta finalmente muere (Zaag de Beer, *et al*, 2001).

Debido a su alta variabilidad, este hongo no solo ha sido encontrado en la enfermedad del Mal de Panamá, también se ha encontrado su presencia en heridas ocasionadas por Sigatoka Negra, al igual que la de otros hongos asociados a esta enfermedad (Coello, 2015).

### **1.3.3 Otras enfermedades**

*Colletotricum* sp. es un hongo que se caracteriza por afectar principalmente al género *Musa*. Este hongo por lo general está asociado a la enfermedad del Mal de Panamá, pero en ciertas heridas de Sigatoka se ha encontrado la presencia del mismo (Coello, 2015).

Este hongo también es responsable de algunas enfermedades que se dan tras la cosecha del banano, como la antracnosis. Esta enfermedad se caracteriza por infectar principalmente al fruto más no a la hoja. Los síntomas de esta enfermedad por lo principal se presentan como lesiones hundidas y ovaladas, con presencia de acérvulos, que son identificados como masas de esporas. La infección de este hongo se da en las fases de desarrollo y crecimiento, pero permanece latente hasta que el fruto logre madurar o hasta que

otro hongo ingrese a la planta. Existen reportes que indican la presencia de este hongo dentro de las heridas provocadas por la Sigatoka Negra (Restrepo, 2012).

Finalmente, existen reportes que indican que varios de estos hongos en estudio son patógenos latentes dentro de los cultivos de banano. Esto quiere decir que estos hongos se encuentran presente en el banano mucho antes de producir síntomas dentro del cultivo. Estos síntomas pueden desencadenarse una vez que la planta sea sometida a cierto estrés o cuando el banano o el hongo lleguen a cierta etapa de madurez. Es importante el estudio de esta coexistencia como una herramienta para desarrollar métodos de control (Photita, 2004).

#### **1.4 Diagnóstico de enfermedades**

Para el diagnóstico y detección de enfermedades dentro del banano se utilizan varios métodos, entre los cuales se destacan la identificación microscópica, pruebas de ELISA y la identificación molecular (Piedrahita *et al*, 2008)

La identificación microscópica consiste en la observación de las estructuras del microorganismo, en este caso, del micelio de demás estructuras germinativas del hongo. Para poder diagnosticar la presencia de un hongo en una planta, se necesita primero aislar este hongo, sembrarlo dentro de un medio de cultivo y posteriormente la formación de estructuras reproductivas como los conidios o las esporas. Una de las ventajas de este método es que es sencillo y rápido de utilizar, pero una de las limitaciones puede ser el lograr que el hongo esporule para poder observar las estructuras, ya que cada hongo tiene sus requerimientos especiales, por ejemplo, algunos necesitan luz negra para este proceso. Además generalmente, este método solo permite identificar género más no llegar a la especie, y es por eso que se han desarrollado otros métodos para el diagnóstico de enfermedades (Piedrahita *et al*, 2008).

Las pruebas de ELISA es una técnica inmunoenzimática que consiste en la interacción entre un antígeno (patógeno) y un anticuerpo (inmunoglobulinas). La positividad de la prueba se da a través de la acción de la unión del antígeno con el anticuerpo sobre un sustrato específico. Las ventajas de este método radican en la gran sensibilidad y especificidad que tiene esta prueba, así también como los bajos costos y la oportunidad de hacer varias pruebas a la vez. (Piedrahita *et al*, 2008). Sin embargo, si estamos buscando un método más específico y de mayores resultados, estas sin duda son las pruebas moleculares.

Para la identificación molecular de estos hongos se usan diversas técnicas que se basan en extracción de ADN, PCR y secuenciación de las regiones ITS de los genes ribosomales de los hongos. Uno de los más utilizados por su alto grado de variabilidad es la secuenciación de las regiones ITS. Estas regiones han sido utilizadas para establecer relaciones filogenéticas. Las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) sirven como iniciador específicos para lograr amplificar y secuenciar segmentos de ADN ribosomal. Estas regiones son las más usadas para el secuenciamiento en hongos por diversas razones, entre las cuales se destacan su alta variabilidad, lo que es fundamental para la elaboración de análisis filogenéticos y además que estas regiones pueden ser amplificadas con facilidad por iniciadores universales (Berrouet, et al, 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

- Identificar de forma microscópica y molecular los hongos asociados a *Mycosphaerella fijiensis* (Sigatoka Negra) en banano.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Subcultivar las cepas de *Mycosphaerella* sp, *Colletotricum* sp, *Nigrospora* sp y *Fusarium* sp previamente aisladas a partir de cultivos aislados de heridas foliares de banano.
- Identificar morfológicamente las cepas subcultivadas mediante observación microscópica
- Identificar molecularmente las cepas subcultivadas por medio de la secuenciación de región ITS de los genes ribosomales
- Caracterizar filogenéticamente los hongos identificados usando la región ITS.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El banano representa una fuente importante de ingresos para el Ecuador. Dentro del PIB total, las exportaciones de banano representan el 4%, es decir cerca de 1017 millones de dólares anuales. Según reportes del 2013, alrededor de 230.000 ha fueron plantadas de banano en el Ecuador, convirtiéndolo en uno de los cultivos más extensos del país (INEC, 2013)

El estudio de la Sigatoka Negra es de suma importancia ya que se ha demostrado que es una enfermedad devastadora para el banano. Esta enfermedad es capaz de reducir hasta en un 50% el peso del racimo y causar pérdidas de hasta el 100% de la producción por un deterioro de la longitud y grosor del fruto, es decir la calidad del mismo (Martinez, *et al*, 2011).

La Sigatoka negra, se encuentra presente en todos los países de producción bananera. Esta enfermedad tiene un alto impacto económico ya que afecta la productividad de las plantaciones y además de afectar en los costos de manejo de la misma.

En el presente estudio, se busca comprender si el patógeno responsable de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) trabaja individualmente o está asociado a otros microorganismos patógenos que se encuentran en las lesiones de la enfermedad.

La identificación de estos microorganismos usando herramientas moleculares nos abre un abanico de ventajas y posibilidades. La principal es que conociendo los microorganismos responsables del progreso de la enfermedad nos permitirá crear estrategias de control contra estos patógenos.

#### 4 ÁREA DE ESTUDIO

Los aislados de los hongos son provenientes de la hacienda La Libertad, ubicada en el cantón Valencia en la provincia de Los Ríos, Ecuador, y fueron obtenidos para otro proyecto de titulación de Ingeniería en Agroempresas de la Universidad San Francisco de Quito en el 2015. Dicho proyecto se denominó: “Evaluación del efecto de la saponina extraída de la quinua (*Chenopodium quinoa*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano (*Musa x paradisiaca*)” realizada por el Ing. Ricardo Coello. En el proyecto mencionado anteriormente, se obtuvieron varias cepas de hongos a partir de heridas de Sigatoka negra en banano cultivar Cavendish, que fueron caracterizados por microcopia, y se obtuvieron los siguientes géneros: *Fusarium*, *Collectotricum*, *Cercospora* y *Nigrospora*.

Todos los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de las Universidad San Francisco de Quito, Quito, Pichincha, Ecuador.

## **5 MATERIALES**

### **5.1 Preparación del Medio de Cultivo**

- Medio de cultivo PDA, DIFCO™
- Frascos pyrex
- Cajas Petri de plástico
- Autoclave
- Gentamicina
- Agua destilada
- Plancha de calor

### **5.2 Subcultivo de hongos en medio PDA**

- Cajas de medio PDA con el hongo (Cercospora, Nigrospora, Collectotricum, Fusarium)
- Medio de cultivo PDA DIFCO™
- Cajas Petri
- Parafilm
- Pinzas
- Incubadora
- Bisturí
- Tijera metálica
- Cabina de bioseguridad tipo ii

### **5.3 Identificación microscópica de hongos**

- Microscopio marca Radical, modelo RXL-4T

- Porta objetos
- Cubre objetos
- Cinta adhesiva
- Micelio del hongo
- Azul de metileno
- Gotero

#### **5.4 Extracción de ADN genómico de hongos**

- PowerSoil® DNA Isolation Kit
- Centrifuga
- Vortex
- Tubos
- Pipetas automáticas

#### **5.5 Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

- Buffer GO TAQ® INVITROGEN (10 X)
- MgCl<sub>2</sub> INVITROGEN® (25,0 mM)
- dNTPs (10mM) INVITROGEN®
- Primer ITS1 (10 pmol) INVITROGEN

- Primer ITS4 (10 pmol) INVITROGEN
- Taq DNA Polimerasa GO TAQ® INVITROGEN (5,0 U/μl)
- Microtubos de PCR
- Termociclador LABNET M MULTIGENE GRADIENT 1011020
- Pipetas automáticas

#### **5.6 Purificación del producto de PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s amplificadas**

- Kit comercial PURELINK® GENOMIC DNA para purificación de ADN genómico (INVITROGEN®)
- Espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC NANODROP 2000

#### **5.7 Identificación en base a las secuencias de la región ITS del ADN ribosomal 5.8s amplificadas**

- Herramienta bioinformática BLAST
- Programa informático MEGA 7

#### **5.8 Análisis filogenético de hongos**

- Programa GENEIOUS 10.1.2.
- Programa BEAST.v1.8.4.
- Programa FigTree v1.4.3

## **6 MÉTODOS**

### **6.1 Preparación de medios**

La preparación del medio de cultivo PDA corresponde a la primera parte del proceso. Para esto, se necesitó una caja de medio de cultivo PDA DIFCO, del cual se recolectaron 49 gramos de medio y se los insertó en un frasco Pyrex. Se disolvieron los 49 gramos en agua destilada para luego ser autoclavado a 121°C por 20 minutos. Posteriormente, se colocó gentamicina en una proporción de 160mg/L de medio. Una vez colocado el antibiótico se dispensó el medio dentro de cajas Petri para dejarlo enfriar. Las cajas con medio se almacenaron a 4°C, hasta su posterior uso.

### **6.2 Subcultivo de hongos en medio PDA**

Se utilizó las cajas Petri con las cepas de los hongos previamente aislados en el proyecto anterior realizado por Ricardo Coello para hacer el subcultivo de los mismos. Para realizar el subcultivo, se utilizó un bisturí para cortar un pequeño trozo de agar con el hongo a subcultivar y se colocó en una nueva caja Petri con medio PDA. Todo este proceso se realizó dentro de una Cabina de bioseguridad tipo II y se realizó por duplicado para cada cepa. Se usó parafilm para sellar las cajas y se las incubó a 30°C por 7 días.

### **6.3 Identificación Microscópica de hongos**

Luego de 7 días, se procedió a realizar una identificación microscópica de los mismos. Para esto, se utilizó cinta adhesiva que se presiona sobre el hongo con la finalidad de que se quede pegado una pequeña cantidad de micelio. Luego, sobre un portaobjetos se colocó una gota de azul de metileno y sobre esta se puso la cinta adhesiva que contenía el micelio del

hongo con el fin de observar las estructuras filamentosas de los hongos e identificarlo con la ayuda de una clave.

#### **6.4 Extracción de ADN genómico de hongos**

Se utilizó el kit PowerSoil® DNA Isolation siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se colocó 0.25 gramos de la muestra a extraer dentro del PowerBead Tubes y se lo agitó durante 10 segundos en el vortex. Luego, se agregó 60ul de la Solución C1 y nuevamente se lo agitó en el vortex a máxima velocidad durante 10 minutos. Luego se colocó los tubos dentro de la centrifuga y se lo centrifugó a 10000RPM durante 30 segundos. Se transfirió el sobrenadante a un Collection Tube de 2ml. Se añadió 250ul de la Solución C2, se colocó en el vortex durante 5 segundos y se lo incubó a 4°C por 5 minutos. Luego se centrifugaron los tubos a 10000RPM durante 1 minuto. Se tomaron 600ul del sobrenadante y se lo transfirieron a otro Collection Tube de 2ml. Posteriormente, se añadieron 200ul de la Solución C3 y nuevamente se lo incubó a 4°C por 5 minutos. Luego se centrifugaron los tubos a 10000RPM durante 1 minuto. Se transfirió 750ul del sobrenadante a un Collection Tube de 2ml. Se agregó 1.2ml de la Solución C4 al sobrenadante y se colocó en el vortex durante 5 minutos. Se colocó 675ul de la mezcla en el Spin Filter y se lo centrifugó a 10000RPM por un minuto, este paso se lo repitió dos veces más. Luego, se agregó 500ul de la Solución C5 y se lo centrifugó a 10000RPM durante 5 segundos. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó el tubo bajo las condiciones previamente descritas. Se colocó otro Spin Filter dentro del tubo y se agregó 100ul de la solución C6. Finalmente se centrifugó a 10000RPM durante 30 segundos, se retiró el Spin Filter y se obtuvo el ADN extraído del hongo.

### **6.5 Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para la amplificación mediante PCR de las regiones ITS1, ITS2 y 5.8s ARN ribosomal, se utilizó primers universales. La secuencia para el primer ITS1 es TCCGTAGGTGAACCTGCGG, y para el primer ITS4 es TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al*, 1990). La técnica utilizada para la amplificación de estas regiones fue estandarizada en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito bajo las especificaciones mostradas en las tablas 1 y 2.

### **6.6 Purificación del producto de PCR, secuenciamiento de la región ITS del ADN ribosomal e identificación de los hongos**

Los productos amplificados se purificaron utilizando el kit *Pure Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Ver Anexo 1.

Una vez que se purificó las muestras, se midió la concentración de ADN en el espectrofotómetro Nanodrop Thermo Scientific 2000. Estas muestras fueron enviadas para su secuenciación a la empresa *Macrogen* (Seúl, Corea del Sur). Esta empresa utiliza como fundamento el secuenciamiento capilar de Sanger. La secuenciación de Sanger tiene como fundamento el uso de la ADN polimerasa para sintetizar cadenas de ADN con una terminación específica. A través de este método se logra generar fragmentos de ADN de diversos tamaños que pueden ser distinguidos por el tipo de marcaje que tienen o por la incorporación de un terminador específico (Necochea, 2004).

Para el alineamiento de las secuencias y generación de una secuencia consenso, se utilizó el programa MEGA 7©. Esta secuencia fue analizada en la base de datos del NCBI© con la herramienta BLAST para conocer la identidad de los aislados mediante comparación

por homología de la secuencia siendo investigada contra las secuencias reportadas en la base de datos abierta GenBank.

### **6.7 Análisis filogenético de hongos**

Una vez que se conoció la identidad de los aislados, se buscó secuencias del mismo hongo en la base de datos de nucleótidos del NCBI© con la herramienta BLAST. En la búsqueda de BLAST se recuperaron alrededor de 50 secuencias para diferentes hongos, bajo un criterio de selección que dependía de la publicación de la secuencia, el país en donde fue hallado y el hospedador al que afecta. Se usaron las secuencias que se demostraron que eran capaces de estar en plantas. Las secuencias se alinearon en el programa computacional Geneious 10.1.2. Posteriormente el análisis filogenético se realizó bajo los criterios de inferencia bayesiana, proporcionada por el programa Beast.v1.8.4 (Drummond et al, 2012). Finalmente se usó FigTree v1.4.3 para la visualización del árbol consenso con los mejores posteriores.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Aislamiento e Identificación de hongos**

Una vez que se logró tener los subcultivos de los hongos, que habían sido incubados a 27°C durante 7 días, se procedió a realizar una identificación microscópica de los mismos y se obtuvieron los resultados presentados en la figura 1.

### **7.2 Caracterización molecular de los hongos**

Una vez concluida la extracción de ADN de todos los patógenos aislados, se visualizó las muestras en un gel de agarosa 2% para observar la presencia de ADN. Se cuantificó la concentración de ADN en las muestras por espectrofotometría mediante el uso del Nanodrop ThermoScientific 2000© que arrojó como resultado una concentración mayor de 50ng/ul para las cuatro muestras estudiadas, la cual es la concentración óptima para la amplificación de regiones ITS (Salgado, 2011) Todas las bandas mostraron un tamaño de 600pb, lo cual era esperado por las regiones amplificadas. Ver figura 2.

### **7.3 Análisis y secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal**

Una vez que se obtuvieron los productos purificados de la amplificación de las región ITS , las muestras fueron enviadas a Macrogen (Corea del Sur) para el secuenciamiento. Ver figura 3.

Estos datos recibidos mediante correo electrónico fueron limpiados, eliminando el ruido y alineándolas con el uso de la herramienta MEGA7. Una vez que se alinearon todas las secuencias, se obtuvo la secuencia consenso, la cual fue comparada con bases de datos mediante el programa BLAST (implementado por el NCBI) para lograr obtener una identidad del patógeno a nivel de especie, en base al porcentaje de similitud que se encuentre con las demás especies guardadas en la base de datos para nucleótidos del GenBank de la NCBI.

#### **7.4 Análisis filogenético de hongos**

A partir la identificación de los aislados, por género y especie, se buscó secuencias de hongos similares de diferentes regiones geográficas para poder realizar un análisis filogenético. Las secuencias se alinearon en el programa computacional GENEIOUS 10.1.2 (Kearse et al, 2012). Posteriormente el análisis filogenético se realizó bajo los criterios de inferencia Bayesiana, proporcionada por el Programa BEAST.v1.8.4 (Drummond et al, 2012). Finalmente se usó FigTree v1.4.3 para la visualización del árbol consenso.

## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 Análisis, identificación y caracterización de hongos

La Sigatoka Negra está identificada como la enfermedad más destructiva del follaje de bananos y plátanos. Esta enfermedad se encuentra asociada al hongo *Mycosphaerella fijiensis*, que se encuentra distribuido alrededor de todo el mundo y es capaz de generar importantes pérdidas económicas. La patogenicidad de este hongo se ve favorecido por las condiciones actuales de cultivo, ya que se utiliza un clon genéticamente uniforme, lo que lo vuelve altamente susceptible y vulnerable a ataques epidémicos. (Manzo-Sanchez, 2005).

Este trabajo se da como continuación a la tesis “Evaluación del efecto de la saponina extraída de la quinua (*Chenopodium quinoa*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano (*Musa x paradisiaca*)” realizada por Ricardo Coello. En donde los resultados encontrados en las heridas de las hojas de banano fueron identificados microscópicamente arrojando como resultado la presencia de *Cercospora*, *Nigrospora*, *Fusarium* y *Collectotricum*.

La *Mycosphaerella fijiensis* y la *Cercospora fijiensis* corresponden al mismo hongo, solo que en diferentes etapas de su ciclo de vida. El hongo *Mycosphaerella* representa a la fase sexual de este hongo y corresponde a la clase de los Ascomycetae. Por otro lado, el hongo *Cercospora* corresponde a la fase asexual del hongo y pertenece a la clase Hyphomycetae. (Manzo-Sanchez, 2005). Si bien ambos hongos se encuentran presentes en el desarrollo de la enfermedad, es la fase sexual la que es capaz de generar los síntomas y todos los problemas que se producen en el banano.

En la Figura 1 se puede observar la morfología de los aislados, que con la ayuda de una clave, puede ser el primer paso para una correcta identificación. Luego que se ha realizado una identificación morfológica, es indispensable realizar una identificación

molecular para conocer el género y la especie del aislado. En la Tabla 3 se puede observar los resultados de dicha identificación. Resulta curioso observar que existe la presencia de más de un hongo dentro de estas heridas, ya que se solía considerar que la Sigatoka Negra era una enfermedad en la cual *Mycosphaerella* actuaba de manera individual (Bornacelly, 2009).

Existen varios reportes en los que se indica la patogenicidad del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Este hongo se encuentra principalmente atribuido a la enfermedad denominada antracnosis. La antracnosis está identificada como una enfermedad post cosecha que se caracteriza por ocasionar la podredumbre del fruto ocasionando lesiones y heridas representadas por manchas negras. Existen escasos reportes de la infección de este hongo en banana, pero un estudio elaborado por Intan Sakinah en el 2013 fue publicado como el primer reporte de la infección de este hongo a la planta, ocasionando infección en el 80% de los frutos en estudio en Malasia (Intan Sakinah, 2013). Si bien esta no es una enfermedad de hoja si no de fruta, la presencia de este hongo dentro de los aislados puede ser interesante para posteriores estudios. El principal factor que podría influir para que ocurra la presencia de este hongo en las heridas, es el mal manejo post cosecha del fruto. Es decir, no tener un correcto manejo y almacenaje de la fruta una vez que ya se ha cosechado (Lenné, 1991)

Otro hongo encontrado en las heridas e identificado en este estudio es *Fusarium equiseti*. Este hongo se encuentra categorizado como un patógeno débil y no se han encontrado reportes dentro del banano. Si bien es un patógeno débil, se comprobó mediante un estudio que es capaz de ocasionar lesiones en las leguminosas y en los cereales. Un patógeno débil es aquel que puede ocasionar infecciones leves dentro del hospedador sin causar la muerte del mismo (Lenné, 1991) Este puede ser un patógeno de raíz y se caracteriza por producir una micotoxina llamada nivalenol. Esta es una micotoxina capaz de producir lesiones y podredumbre en las raíces de los cereales principalmente (Goswami, 2008).

Finalmente, otro hongo hallado en estas heridas foliares del banano e identificado a través del secuenciamiento de regiones ITS fue *Nigrospora oryzae*. Este patógeno ha tomado una relevancia importante en la actualidad ya que las enfermedades de la palma han empezado a crecer, y dentro de los aislados de las heridas, uno de los hongos más encontrados es *Nygrospora oryzae* (Abass, 2014). Este hongo también ha sido encontrado varias veces como un hongo endófito del banano, dependiendo su mayor presencia principalmente en la edad del fruto. No se ha logrado identificar si este hongo mantiene una relación simbiótica con el banano, más bien algunos estudios afirman que este hongo puede llegar a vivir como endófito pero llegar a ser un patógeno oportunista (Photita, 2001)

Si bien algunos de estos hongos no han logrado ser identificados como patógenos específicos del banano, en más de una ocasión se los ha encontrado como endófitos. Se ha encontrado que tanto *Colletotrichum gloeosporioides* como *Nigrospora oryzae* son capaces de vivir dentro de la planta y esperar el momento de una infección para actuar (Photita, 2004). Es por esto que resulta curioso encontrar estos patógenos dentro de las infecciones del banano, pueden ser patógenos latentes que están esperando el momento en que la planta deprima su sistema inmune (como cuando ingresa un hongo tan severo como *Mycosphaerella fijiensis*) para entrar e infectar. Las lesiones de Sigatoka se pueden ver agravadas por la presencia de estos hongos y se puede establecer una hipótesis de que estos hongos trabajan en una especie de simbiosis para ocasionar una mayor lesión y tener efectos más devastadores en el banano.

## **8.2 Análisis filogenético de hongos**

Posterior a la identificación molecular de los hongos aislados, se procedió a encontrar una relación entre los mismos géneros y especies alrededor del mundo. Es por esto que se sacó diferentes secuencias halladas para el mismo hongo en la base de datos del

GenBank/NCBI con la finalidad de realizar árboles filogenéticos y observar la relación entre las muestras aisladas y las distribuidas en otras zonas geográficas. Estas secuencias fueron seleccionadas con un criterio que se basaba en la distribución del hongo, el hospedador al que infecta y la publicación del estudio en el cual se halló esta secuencia. El método utilizado para el desarrollo de estas filogenias fue el de Inferencia Bayesiana. Este método nos explica que tan bien los árboles filogenéticos son explicados por los datos mediante probabilidades. Es por eso que estos tipos de árboles manejan un rango de certeza, en el cual si la probabilidad (llamada posterior en este tipo de análisis) es 1, los datos explican de manera perfecta el árbol filogenético (Peña, 2011).

En la Figura 4, en el árbol correspondiente a *Collectotrichum gloeosporioides*, se tomó como outgroup al hongo *Colletotrichum capsici*, ya que pertenece al mismo género que nuestro hongo aislado. Un outgroup es un taxón externo que no muestra las mismas similitudes con las secuencias que están siendo analizadas dentro del árbol. La finalidad de estos análisis es describir las relaciones evolutivas en base a modelos de substitución entre las muestras encontradas en Ecuador con las que se han reportado alrededor del mundo (Peña, 2011). La filogenia reconstruida para *C. gloeosporioides* muestra una separación de dos clados distintivos, que incluyen a muestras aisladas de regiones geográficas variadas y no relacionadas (sustentadas con un posterior de 1). Dentro de uno de estos clados, nuestra muestra (flecha azul) se ubica como un grupo externo, cuyo ancestro común es compartido por las secuencias del resto del clado (posterior de 0.48). Esto sugiere que en base al modelo usado, es decir de inferencia Bayesiana, las asociaciones entre secuencias tienen un alto nivel de confianza pese a tener posteriores bajos, que se pueden deber a que las regiones son pequeñas y poco informativas. Los árboles de Inferencia Bayesiana asignan valores, llamados posteriores, a los nodos para saber que tan bien describe el resultado a la estructura del árbol. Es decir, las secuencias ingresadas para los árboles manejan valores entre 0.5 y 1 en los

nodos, lo que hace que los agrupamientos presentados describan con un alto nivel de certeza a los datos (Peña, 2011). La secuencia aislada de *Colletotrichum gloeosporioides* que muestra similitud a las halladas en Brasil y Estados Unidos hace mucho sentido, ya que tanto la secuencia de Brasil (mango) como la de Estados Unidos (aguacate) son reportes de antracnosis o de podredumbre de fruta.

En la Figura 5, se utilizó como outgroup al género *Kananascus*, que pertenece a la misma familia de *Nigrospora*. La utilización de este outgroup se da debido a que las únicas secuencias disponibles en la base de datos del NCBI para *Nigrospora* eran *Nigrospora oryzae* y *Nigrospora spherica*. Ambas especies al momento de realizar el análisis filogenético mostraban un índice de similitud muy elevado ya que se encuentran estrechamente emparentadas. Dentro de este árbol, se puede observar que la secuencia estudiada dentro de este trabajo se encuentra ubicada dentro del clado superior, con rangos de certeza bastante aceptables. Dentro de las secuencias que comparten el clado con la hallada en las heridas foliares de banano, se puede encontrar que en la mayoría de los estudios de los cuales salieron esas secuencias se identifica a *Nigrospora oryzae* como un endófito o un patógeno oportunista. No se ha logrado identificar si la presencia de este hongo puede ser benéfica para ciertas plantas, pero si se sabe que *Nigrospora oryzae* es capaz de causar enfermedad a la palma (Abass, 2014)

En la Figura 6, podemos observar como para lograr tener un outgroup se usó una secuencia de *Fusarium oxysporum*. La funcionalidad de un outgroup radica en ser un grupo externo para poder garantizar que las otras secuencias tienen una similitud y parecido entre ellas. Dentro de este árbol, la secuencia aislada de *Fusarium equiseti* mostró ser la misma que la secuencia hallada en México, con una probabilidad de 1, es decir la más alta probabilidad posible. Con respecto a la secuencia hallada en México, se comprobó que el hongo está

actuando como endófito dentro de una planta nativa de México, la *Taxus globosa*. No se reportó si su presencia fue patogénica para la planta. (Martinez-Cardenas, 2011).

Finalmente, en la Figura 7, que corresponde al hongo capaz de ocasionar la Sigatoka Negra, se puede observar que se utilizó a *Mycosphaerella rosigena* como el outgroup. Este árbol nos indica el alto grado de similitud que existe entre la muestra aislada de las heridas de banano con las del resto del mundo. Esto indica que existe la posibilidad de que el hongo que esté afectando al otro lado del mundo (México y Australia) pueda ser el mismo que está presente en el Ecuador, lo que podría resultar como beneficioso ya que al ser un hongo que no presenta mucha variabilidad se podría desarrollar un método eficaz de control que pueda ser empleado en todo el mundo. La ingeniería genética se encuentra en constantes estudios para lograr manipular el ADN del banano y para crear clones resistentes a la Sigatoka Negra. (Marin, 2001)

## 9 CONCLUSIONES

En esta investigación se subcultivaron cepas del género *Cercospora*, *Nigrospora*, *Collectotrichum* y *Fusarium*. Estos hongos fueron extraídos de las heridas foliares de banano en una tesis anterior llamada “Evaluación del efecto de la saponina extraída de la quinua (*Chenopodium quinoa*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Cercospora fijiensis* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano (*Musa x paradisiaca*)” realizada por el Ingeniero en Agroempresas Ricardo Coello.

La principal función de este trabajo fue identificar usando herramientas moleculares los hongos que habían sido identificados microscópicamente. Para la identificación molecular se utilizaron métodos como la extracción de ADN, la amplificación de regiones ITS y el secuenciamiento de las mismas. Una vez que se completó este proceso se pudo identificar con certeza que los hongos aislados de las hojas de banano eran: *Collectotrichum gloeosporioides*, *Fusarium equiseti*, *Nigrospora oryzae* y *Mycosphaerella fijiensis*.

Finalmente, se realizaron análisis filogenéticos de cada uno de los hongos aislados. Para este análisis se usaron árboles de Inferencia Bayesiana ya que permite saber la probabilidad de que los datos estén correctos y permitan elaborar el mejor árbol filogenético. La estructura del árbol es congruente con los datos ingresados y nos permite analizar con mucha certeza la similitud entre las secuencias halladas para el mismo hongo con diferentes hospedadores alrededor del mundo.

## 10 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar análisis de patogenicidad de los aislados para poder entender las relaciones entre los mismos. Es decir, realizar pruebas sobre las hojas de banano inoculando un patógeno a la vez y luego mezclas de los mismos para observar el grado de infección (bioensayos). Se debería medir el tamaño de la herida, rapidez de la infección, efecto sobre la hoja, entre otros parámetros.

Se recomienda realizar un análisis más profundo de los hongos encontrados para poder determinar si son endófitos y si ayudan de alguna manera a la planta. Es decir, si es que vive en algún tipo de relación simbiótica con el banano.

También se recomienda enfocar un poco los esfuerzos hacia encontrar una solución certera para la Sigatoka Negra ya que es una enfermedad devastadora que puede ocasionar pérdidas de hasta millones de dólares. En la actualidad, el mundo se está enfocando mucho en el Fusarium raza 4, que si bien es un patógeno importante, no es el único que puede destruir plantaciones enteras de banano.

Finalmente, se recomienda guardar las muestras aisladas para poder acceder a las mismas siempre que se necesite hacer un nuevo estudio o análisis. Se debe estudiar a mayor profundidad la presencia de estos hongos con la severidad de la enfermedad.

## 11 BIBLIOGRAFIA

- Abass, M. (2014). *Morphological, molecular and pathological study on Nigrospora oryzae and Nigrospora spherica, the leaf spot fungi of date palm*. Recuperado el: 14 de abril del 2017, de [https://www.researchgate.net/publication/292090605\\_morphological\\_molecular\\_and\\_pathological\\_study\\_on\\_nigrospora\\_oryzae\\_and\\_nigrospora\\_sphaerica\\_the\\_leaf\\_spot\\_fungi\\_of\\_date\\_palm](https://www.researchgate.net/publication/292090605_morphological_molecular_and_pathological_study_on_nigrospora_oryzae_and_nigrospora_sphaerica_the_leaf_spot_fungi_of_date_palm)
- Alvarez, E. (2013). *La Sigatoka Negra en plátano y banano*. Recuperado el: 05 de abril del 2017, de <http://www.fao.org/docrep/019/as089s/as089s.pdf>
- Arias, E. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de guasca y cruz verde*. Recuperado el: 11 de abril del 2017, de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
- Berrouet, et al, (2014). *Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis*. Recuperado el: 10 de abril del 2017, de <http://www.redalyc.org/pdf/3190/319030502002.pdf>
- Bornacelly, H. (2009). *Estudio del ciclo de vida de Mycosphaerella fijiensis en tres clones de banano (musa aaa) en tres regiones de la zona bananera del magdalena*. Recuperado el: 04 de abril del 2017, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/716/1/8006001.2009.pdf>
- Coello, R. (2015). *Evaluación del efecto de la saponina extraída de la quinua (Chenopodium quinoa) sobre el crecimiento in vitro de Cercospora fijiensis y Fusarium oxysporum en el cultivo de banano (Musa x paradisiaca)*.
- Fabra, H. (2015). *Causas de pérdidas que se producen en la post cosecha de banano en la zona de Quevedo*. Quevedo. UTEQ. 50p

- Goswami, R. (2008). *Host range and mycotoxin production by Fusarium equiseti isolates originating from ginseng fields*. Recuperado el: 11 de abril del 2017, de <https://www.ndsu.edu/faculty/goswami/Publications/Host%20range%20paper.pdf>
- INIAP. (2010). *Banano plátano y otras musáceas*. Recuperado el: 01 de abril del 2017, de <http://www.iniap.gob.ec/web/banano-platano-y-otras-musaceas/>
- INEC, (2013). *Encuesta de superficie y producción agropecuaria continúa*. Recuperado el: 10 de abril del 2017, de [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac%202013/InformeEjecutivoESPAC2013.Df](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac%202013/InformeEjecutivoESPAC2013.Df)
- Intan Sakinah, M. (2013). *First report of Collectotrichum gloeosporioides causing anthracnose of banana (Musa spp.) in Malaysia*. Recuperado el: 14 de abril del 2017, de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-10-12-0985-PDN>
- Kosiak, et al, (2004). *Morphological, chemical and molecular differentiation of Fusarium equiseti isolated from Norwegian cereals*. Recuperado el: 20 de abril del 2017, de [https://www.researchgate.net/profile/Maria\\_GonzalezJaen/publication/7998428\\_Morphological\\_chemical\\_and\\_molecular\\_differentiation\\_of\\_Fusarium\\_equiseti\\_isolated\\_from\\_Norwegian\\_cereals/links/0c9605320c1e4638d700000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Maria_GonzalezJaen/publication/7998428_Morphological_chemical_and_molecular_differentiation_of_Fusarium_equiseti_isolated_from_Norwegian_cereals/links/0c9605320c1e4638d700000.pdf)
- Lenné, J. (1991). *Factors influencing the germination of pathogenic and weakly pathogenic isolates of Collectotrichum gloeosporioides on leaf surfaces of Stylosanthes guianensis*. Recuperado el: 20 de abril del 2017, de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756209810174>
- Manzo-Sanchez, G, et al (2005). *La biología de Mycosphaerella fijiensis y su interacción con Musa spp*. Recuperado el: 04 de abril del 2017, de

[https://www.researchgate.net/publication/233401158\\_La\\_biologia\\_de\\_Mycosphaerella\\_fijiensis\\_y\\_su\\_interaccion\\_con\\_Musa\\_spp](https://www.researchgate.net/publication/233401158_La_biologia_de_Mycosphaerella_fijiensis_y_su_interaccion_con_Musa_spp)

Marin, D. (2005). *Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation*. Recuperado el:

20 de abril del 2017, de

<http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.3.208>

Martinez, I, et al, (2011). *Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano*. Recuperado

el: 06 de abril del 2017, de

<http://www.infoagro.net/programas/Ambiente/pages/adaptacion/casos/Sigatoka.pdf>

Peña, C. (2011). *Métodos de inferencia filogenética*. Recuperado el: 15 de abril del 2017, de

<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v18n2/pdf/a23v18n2.pdf>

Photita, W. (2004). *Are some endophytes of Musa acuminata latent pathogens?*. Recuperado

el: 07 de abril del 2017, de <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/16-4.pdf>

Photita, W. (2001). *Endophytic fungi of wild banana (Musa acuminata) at Doi Suthep Pui*

*National Park, Thailand*. Recuperado el: 14 de abril del 2017, de

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756208620377>

Phoulivong, S. (2010). *Collectotrichum gloeosporioides is not a common pathogen on*

*tropical fruits*. Recuperado el: 20 de abril del 2017, de

<https://link.springer.com/article/10.1007/s13225-010-0046-0>

Piedrahita et al. (2008). *Diagnóstico de enfermedades de origen biótico en plantas*.

PROECUADOR. (2016). *Análisis sectorial banana*. Recuperado el: 01 de abril del 2017 de,

[http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2016/09/PROEC\\_AS2016\\_BANANO.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wpcontent/uploads/2016/09/PROEC_AS2016_BANANO.pdf)

Restrepo, J. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del plátano*. Recuperado el: 07 de abril

del 2017, de

[http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/Docs\\_Resources\\_2015/T4/cartilla-platano-ICA-final-BAJA.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/Docs_Resources_2015/T4/cartilla-platano-ICA-final-BAJA.pdf)

Salgado, C. (2011). Identificación molecular de especies de molinilla spp. que afectan la producción de durazno, Prunus pérsica, en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. Quito, Pichincha, Ecuador.

Sotomayor, I. (2012). *La raza tropical 4 de Mal de Panamá: amenaza potencial para la industria bananera y platanera del Ecuador*. Recuperado el: 06 de abril del 2017, de [http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/Docs\\_Resources\\_2015/T4/bananera1.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/banana/documents/Docs_Resources_2015/T4/bananera1.pdf)

White et al, (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Recuperado el: 22 de abril del 2017.

Zaag De Beer, et al, (2001). *Enfermedad del falso Mal de Panamá*. Recuperado el: 06 de abril del 2017, de [http://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx\\_news/False\\_Panama\\_disorder\\_on\\_banana\\_720\\_ES.pdf](http://www.biodiversityinternational.org/uploads/tx_news/False_Panama_disorder_on_banana_720_ES.pdf)

## 12 FIGURAS

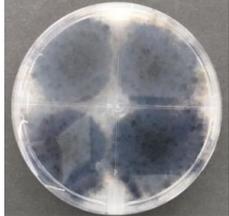
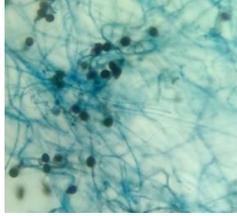
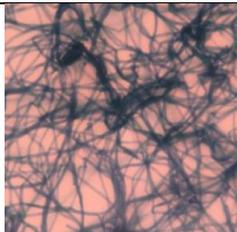
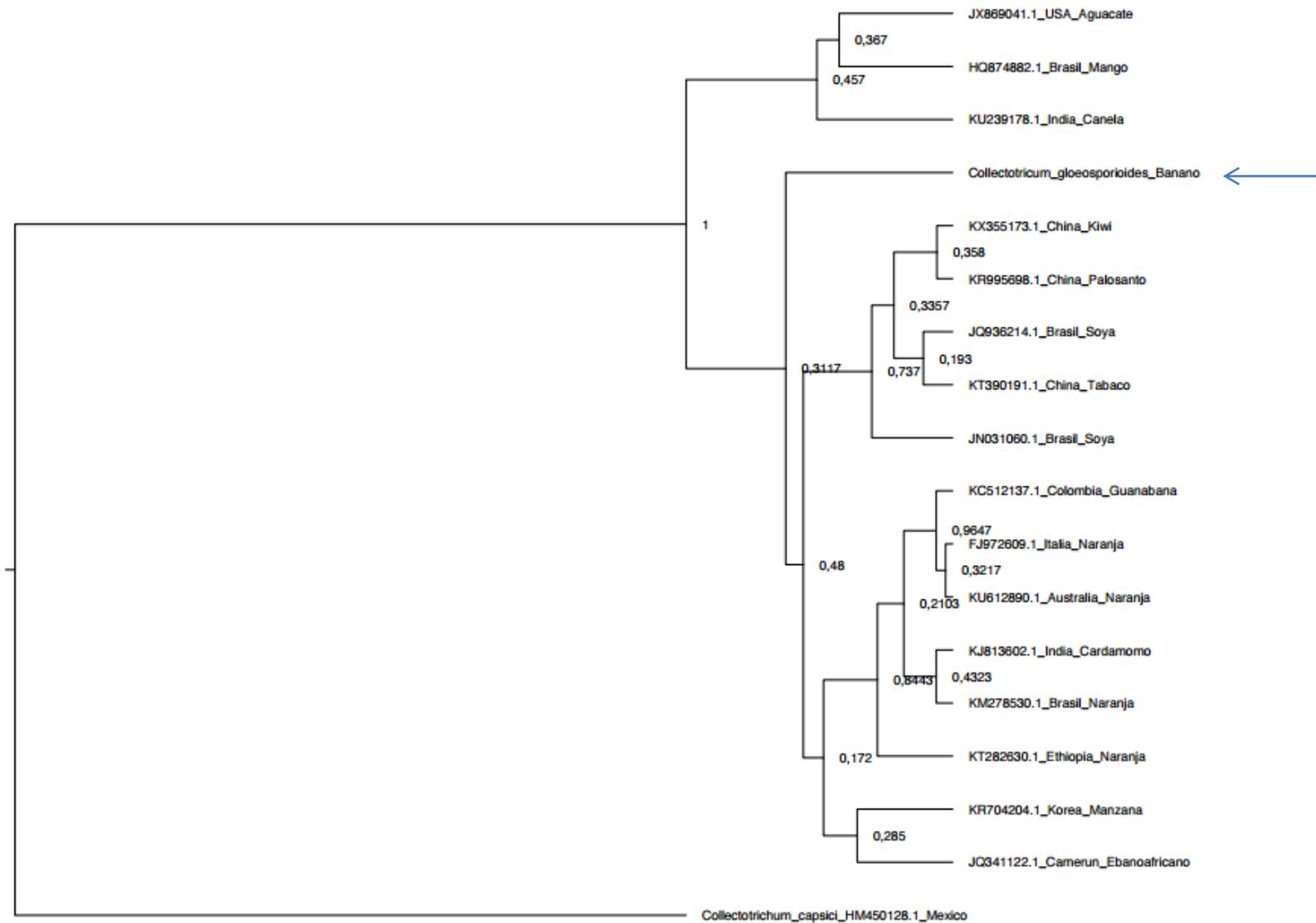
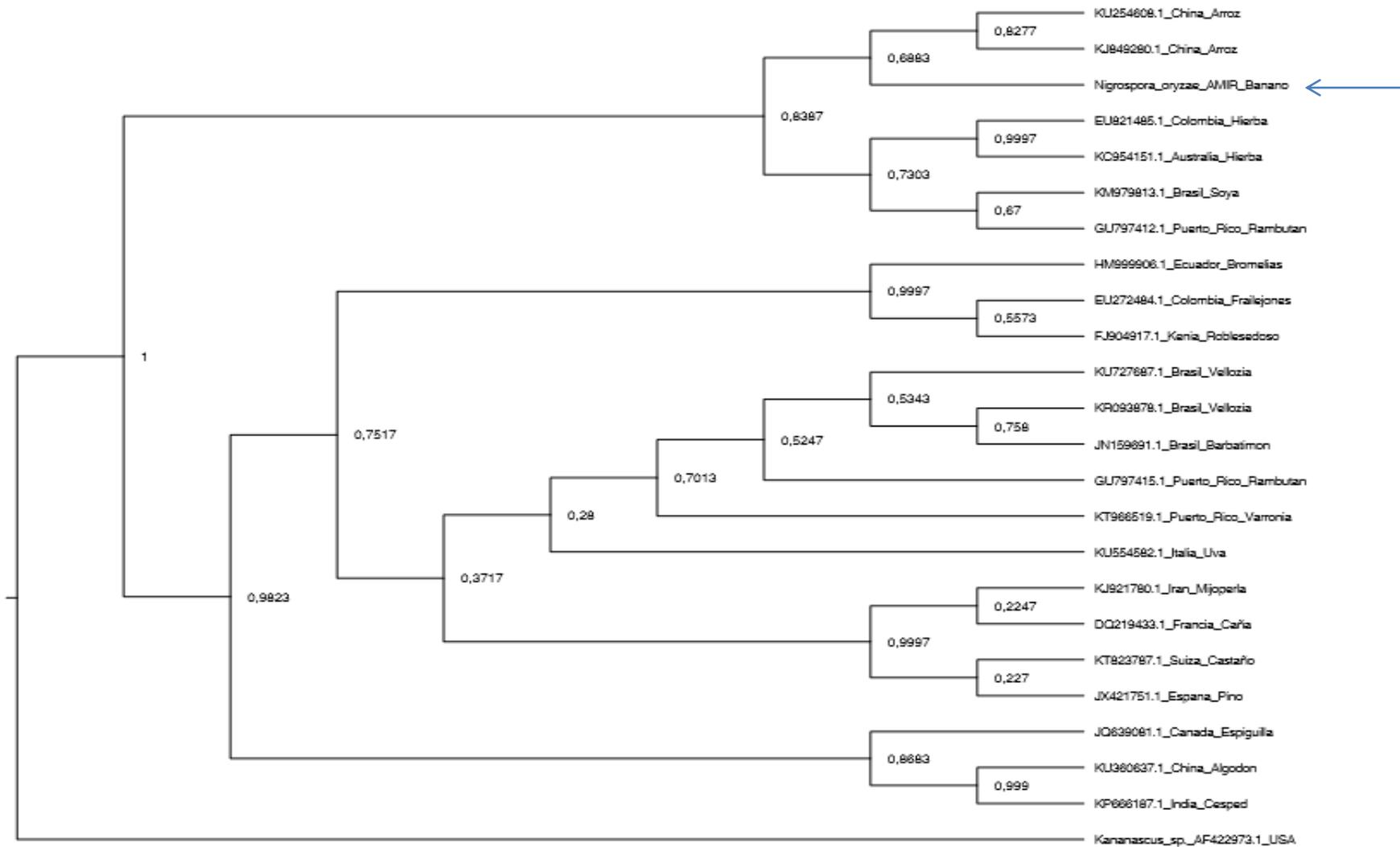
| Aislado   | Identificación microscópica | Vista Frontal   | Vista Posterior   | Descripción   | Microscopia   |
|-----------|-----------------------------|---|---|---|---|
| Aislado 1 | <i>Collectotricum</i> sp.   |    |    | Colonias lisas, irregulares de color gris-negro. Esporas alargadas con segmentación horizontal      |    |
| Aislado 2 | <i>Nigrospora</i> sp.       |    |    | Colonias blancas con halo negro. Conidióforo alargado y segmentado con una conidia teñida de negro. |    |
| Aislado 3 | <i>Fusarium</i> sp.         |   |   | Colonias color café, irregulares y afelpadas. Esporas agrupadas, alargadas y sin segmentación       |   |
| Aislado 4 | <i>Mycosphaerella</i> sp.   |  |  | Colonias compactas y afelpadas. Esporas alargadas y con segmentación                                |  |

Figura 1: Identificación microscópica de las cepas *Collectotricum* sp, *Nigrospora* sp, *Fusarium* sp, *Mycosphaerella* sp a una magnitud de 100X

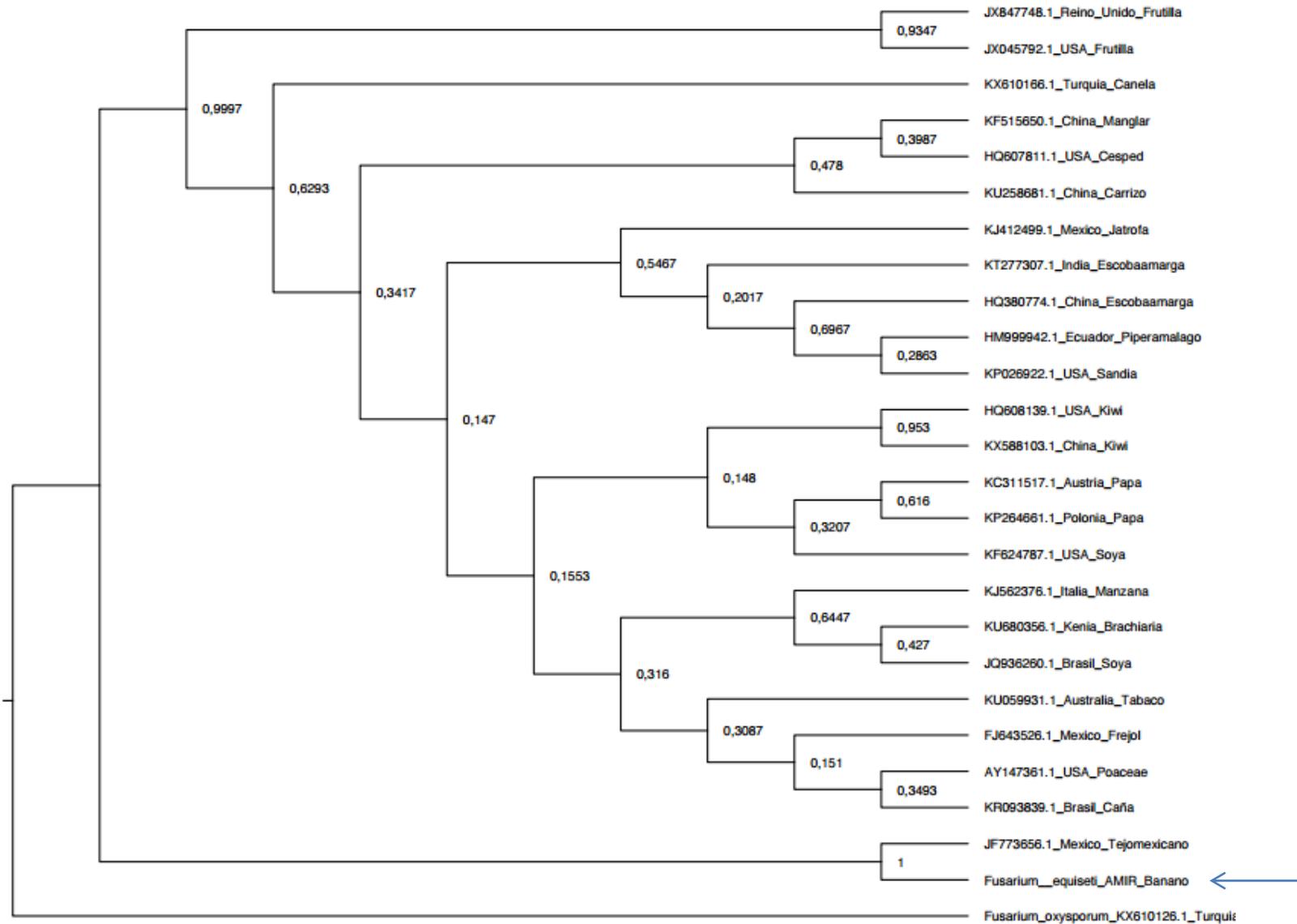




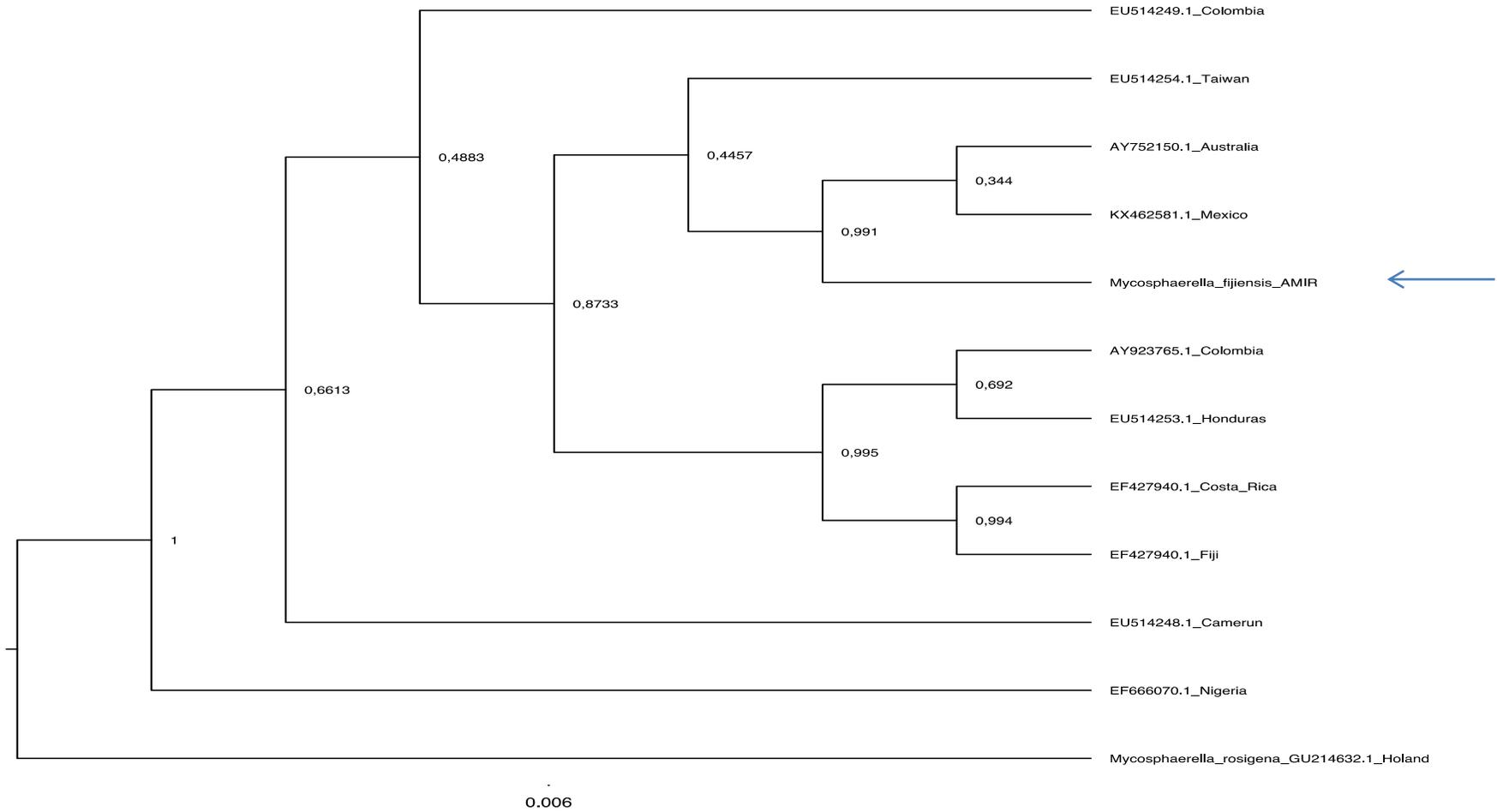
**Figura 4:** Arbol filogenético de inferencia Bayesiana. Análisis filogenético de la región ITS de *Colletotrichum gloeosporioides*.



**Figura 5:** Arbol filogenético de inferencia Bayesiana. Análisis filogenético de la región ITS de *Nigrospora oryzae*.



**Figura 6:** Arbol filogenético de inferencia Bayesiana. Análisis filogenético de la región ITS de *Fusarium equiseti*.



**Figura 7:** Arbol filogenético de inferencia Bayesiana. Análisis filogenético de la región ITS de *Mycosphaerella fijiensis*.

## 13 TABLAS

**Tabla 1:** Cantidad de reactivos utilizados para una reacción de PCR de la región ITS del ADN ribosomal.

| Reactivos           | Volumen para1x |
|---------------------|----------------|
| Buffer 10 X         | 5µl            |
| MgCl <sub>2</sub>   | 4µl            |
| dNTPs(10mM)         | 2µl            |
| Primer ITS1(10pmol) | 2µl            |
| Primer ITS4(10pmol) | 2µl            |
| Taq polimerasa      | 1µl            |
| ADN                 | 2µl            |
| H <sub>2</sub> O    | 32µl           |
| Volumen total       | 50µl           |

**Tabla 2:** Tiempo utilizados en el programa de PCR para la amplificación de la región ITS.

| Programa                  | T°     | Tiempo     | Ciclos   |
|---------------------------|--------|------------|----------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C  | 5 minutos  |          |
| Desnaturalización         | 94 °C  | 1 minuto   | 35CICLOS |
| Hibridación               | 62.3°C | 2 minutos  |          |
| Polimerización            | 72 °C  | 2 minutos  |          |
| Extensión Final           | 72 °C  | 10 minutos |          |
| Reposo                    | 10 °C  | 10 minutos |          |

**Tabla 3:** Identificación molecular de los aislados con los resultados obtenidos en la plataforma BLAST para las secuencias de la región ITS.

| Aislado   | Resultado del Secuenciamiento          | Max SCORE | E-value | Iden | Acc.       |
|-----------|--|-----------|---------|------|------------|
| Aislado 1 | <i>Collectotrichum gloeosporioides</i> | 569       | 1e-158  | 99%  | KX960911.1 |
| Aislado 2 | <i>Nigrospora oryzae</i>               | 767       | 0.0     | 100% | KX958066.1 |
| Aislado 3 | <i>Fusarium equiseti</i>               | 802       | 0.0     | 100% | KX588103.1 |
| Aislado 4 | <i>Mycosphaerella fijiensis</i>        | 848       | 0.0     | 100% | AY923762.1 |

**Tabla 4:** Revisión bibliográfica de hongos aislados

| Hongo Identificado                    | Cultivo Identificado                    | Origen            | Tipo de Interacción | Descripción  | Referencia             |
|---------------------------------------|---|-------------------|---------------------|--|------------------------|
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | Papaya ( <i>Carica papaya</i> )         | Trinidad & Tobago | Patógeno            | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> es un hongo patógeno que puede infectar a más de 470 géneros de fruta, incluyendo la papaya. | Rampersad, 2012.       |
|                                       | Frutilla ( <i>Fragaria × ananassa</i> ) | Estados Unidos    | Patógeno            | Se ha comprobado que el hongo se encuentra distribuido dentro de toda Florida y que causa enfermedad en frutilla.                  | Mackenzie, et al, 2007 |
|                                       | Calabaza ( <i>Cucurbita pepo</i> )      | Trinidad & Tobago | Patógeno            | Se observaron síntomas de necrosis foliar en 15 plantaciones comerciales de calabaza.  | Rampersad, 2010.       |
|                                       | Palmito ( <i>Syagrus oleracea</i> )     | Brasil            | Patógeno            | Se inoculó el hongo en 20 plantas, de las cuales todas presentaron lesiones.   | Charchar, et al, 2002. |

|                          |                                     |          |          |  |                        |
|--------------------------|-------------------------------------|----------|----------|--|------------------------|
| <i>Nigrospora oryzae</i> | Algodón ( <i>Gossypium</i> )        | China    | Patógeno | Se observaron síntomas de infección en el 30% de plantas cultivadas en un terreno de 4 ha.               | Zhang et al, 2012      |
|                          | Aloe vera ( <i>Aloe vera</i> )      | Pakistan | Patógeno | El 47% de las plantas localizadas en 25 invernaderos mostraron lesiones.                                 | Alam, et al, 2017      |
|                          | Caña ( <i>Arundo donax</i> )        | Francia  | Patógeno | En una muestra de 40 plantas, el 50% mostró signos de lesión.  | Widmer, et al, 2006    |
|                          | Espiguilla ( <i>Poa pratensis</i> ) | Canadá   | Patógeno | Se comprobó que este hongo no es específico para un hospedador, puede atacar a diversos tipos de hierba. | Zheng, et at, 2012.    |
| <i>Fusarium equiseti</i> | Pacana ( <i>Carya illinoensis</i> ) | Brasil   | Patógeno | Se realizó una inoculación en 20 semillas, de las cuales el 40% mostró síntomas.                         | Lazarotto et al., 2014 |
|                          | Rúcula ( <i>Eruca sativa</i> )      | Italia   | Patógeno | El hongo mostró patogenicidad en las diez plantas estudiadas.  | Garibaldi et al., 2011 |

|                                 |                                     |                |          |   |                       |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------|----------|---|-----------------------|
| <i>Fusarium equiseti</i>        | Sandía ( <i>Citrullus lanatus</i> ) | Estados Unidos | Patógeno | El 25% de plantas localizadas en 12 ha de Georgia mostraron infección.                                    | Y Li, 2015            |
|                                 | Soya ( <i>Glycine max</i> )         | Argentina      | Patógeno | En las 400 semillas estudiadas se vieron síntomas por la presencia del hongo                              | Gally, et al, 1998    |
| <i>Mycosphaerella fijiensis</i> | Banano ( <i>Musa paradisiaca</i> )  | Puerto Rico    | Patógeno | Se encontró la presencia del hongo en 19 individuos.  | Irish, et al, 2006    |
|                                 | Banano ( <i>Musa paradisiaca</i> )  | Colombia       | Patógeno | Se aisló este hongo de heridas foliares de 40 plantas de banano   | Arzanlou, et al, 2008 |
|                                 | Banano ( <i>Musa paradisiaca</i> )  | Brasil         | Patógeno | Hongos aislados de plantas con Sigatoka Negra fueron inoculados en otras plantas para ver su resistencia. | Santos, et al, 2006   |
|                                 | Banano ( <i>Musa paradisiaca</i> )  | Ecuador        | Patógeno | El hongo fue aislado de heridas foliares del banano.  | Coello, 2015          |

## 14 ANEXOS

### 14.1 Anexo A: Metodología de la purificación de las regiones ITS del ADN ribosomal

#### 5.8S amplificadas

1. Se colocó la columna de filtración dentro del tubo eppendorf.
2. En el centro de la membrana se depositó, 50µl del producto amplificado con 200µl de la solución buffer de unión a la membrana.
3. Se incubó durante 1minuto a temperatura ambiente.
4. Se centrifugó por 1minuto a 10000rpm.
5. Se descartó el desecho recolectado en el tubo eppendorf.
6. Se agregó 650µl de solución buffer de lavado de la membrana con etanol, sobre la muestra que se encuentra en la columna de filtración.
7. Se centrifugó por 1min a 10000 rpm y nuevamente descartando el desecho del tubo recolector.
8. Se centrifugó nuevamente a 10000 rpm, por 3 minutos.
9. Al final se añadió 50µl de buffer de elución en la columna de filtración.
10. Se incubó durante 1minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos.
11. Se descartó la columna de filtración.
12. El volumen obtenido en el tubo eppendorf constituye el producto amplificado y purificado