

Aplicación de marcadores ISSR en la determinación de la similitud genética de *Pseudocercospora fijiensis*

Gilberto Manzo-Sánchez^{1*}; Carlos Luis Leopardi-Verde¹; Marco Tulio Buenrostro-Nava¹; Mario Orozco-Santos²; Blondy Canto-Canche³; Ignacio Islas-Flores⁴; Luciano Martínez-Bolaños⁵

¹Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México. ²Centro de Investigación Regional Pacífico Centro. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tecomán, Colima, México. ³Unidad de Biotecnología, ⁴Unidad de Biología Integrativa, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. ⁵Universidad Autónoma Chapingo, Tabasco, México.

***Autor de**

Correspondencia:

Gilberto Manzo-Sánchez
gmanzo@ucol.mx

Contribución:

Científica

Sección:

Fitosanidad

Recibido:

15 Diciembre, 2023

Aceptado:

15 Enero, 2024

Publicado:

06 Abril, 2024

Cita:

Manzo-Sánchez G,
Leopardi-Verde CL,
Buenrostro-Nava MT,
Orozco-Santos M, Canto-
Canche B, Islas-Flores I y
Martínez-Bolaños L. 2024.
Aplicación de marcadores
ISSR en la determinación
de la similitud genética de
Pseudocercospora fijiensis.
Acorbat Revista de
Tecnología y Ciencia 1(1):
21
<https://doi.org/10.62498/AR.TC.2421>

RESUMEN

Conocer la diversidad y similitud genética de *Pseudocercospora fijiensis* nos permite estimar el potencial de evolución de las poblaciones del patógeno dentro de diferentes agroecosistemas. En el presente estudio se analizaron, mediante marcadores ISSR, 74 aislamientos de *P. fijiensis* provenientes de cuatro estados de la república mexicana: Colima, Michoacán, Tabasco y Chiapas. Los resultados muestran 25 alelos polimórficos presentes en todos los aislamientos. En el análisis de similitud genética, el dendrograma sugiere que existen cuatro grupos (I-IV), cada uno conformado por aislados con el mismo origen geográfico. Esta información demuestra la utilidad de los marcadores ISSR para determinar la similitud genética de *P. fijiensis* de México, basada principalmente por su origen geográfico.

Palabras clave: Sigatoka negra, plátano y banano, marcadores de ADN, fitosanidad.

ABSTRACT

Understanding the similarity and genetic diversity of *Pseudocercospora fijiensis* allows us to assess the evolutionary potential of the pathogen in different agroecosystems. In this study, we analyzed 74 isolates of *P. fijiensis* collected from four Mexican states: Colima, Michoacán, Tabasco, and Chiapas, using ISSR markers. The results revealed the presence of 25 polymorphic alleles across all isolates. Genetic similarity analysis suggests the existence of four distinct groups (I-IV), with isolates within each group sharing the same geographical origin. These findings highlight the utility of ISSR markers in assessing the genetic similarity of *P. fijiensis* in Mexico, primarily based on its geographic distribution.

Keywords: black Sigatoka, banana and plantain, DNA markers, phytosanity.



INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la estructura genética de poblaciones es importante para entender la biología de la población de patógenos (McDonald, 1997). Dicha información puede ser usada para inferir el impacto de las diferentes fuerzas evolutivas que pueden inducir cambios en la biología de las poblaciones de los patógenos (p. ej. la aplicación de fungicidas) y con esto estimar el potencial de evolución dentro del agroecosistema (Leung et al., 1993; McDonald, 1997), por ello la información generada puede contribuir a una mejor comprensión del patosistema y por consiguiente coadyuvar al diseño de nuevas estrategias de manejo.

Un estudio entre diferentes países demostró que las poblaciones de *Pseudocercospora fijiensis* mantienen un alto nivel de diversidad genética en el Sureste Asiático (centro de origen) y que la recombinación desempeña un papel importante en la evolución de este patógeno (Carlier et al., 1996). Otros estudios han descrito la diversidad genética entre países y continentes, así como también dentro de un país, entre diferentes localidades y cultivares (Carlier et al., 1996; Hayden et al., 2005; Manzo-Sánchez et al., 2019). Los marcadores ISSR tienen como ventaja su capacidad para evidenciar la variación genética, así como en su reproducibilidad (Lynch y Milligan, 1994). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la similitud genética de los aislados de *P. fijiensis* de distintas regiones productoras de plátano en México, utilizando marcadores ISSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *P. fijiensis*. El aislamiento del hongo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Colima, de acuerdo con el método de descargas de ascosporas descrito por Stover (1976). La observación de las ascosporas se llevó a cabo con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Leica). Una vez identificadas, individualmente se cultivaron en medio PDA para permitir su crecimiento por colonias. La incubación se realizó en oscuridad a 26 °C durante 21 días en cámara de crecimiento (Novatech).

Extracción de ADN. Colonias monospóricas fueron sembradas en medio líquido V8 para el crecimiento del micelio. La incubación se realizó en agitador orbital (Lab line) de tres a cinco días a 100 rpm y 27 °C. El micelio seco se molió en un mortero frío estéril con nitrógeno líquido, hasta que se obtuvo un polvo fino. Por cada aislado, 40 mg de polvo se colocaron en tubos Eppendorf estériles de 2.0 mL con 1.0 mL de

amortiguador de extracción (Tris-HCl pH 8.0 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, PVP 1%, SDS 1%, CTAB 3% y 20 μ L de β -mercaptoetanol), se incubaron en baño maría durante 30 min con agitación por inversión constante, enseguida se adicionó 1 volumen de solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló; enseguida se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4 °C, y la fase acuosa obtenida, se transfirió a tubos Eppendorf estériles.

Marcadores ISSR. Para la PCR se utilizaron los oligonucleótidos universales ISSR810 (5' GAGAGAGAGAGAGAT 3') e ISSR809 (5' AGAGAGAGAGAGAGAGG 3') se preparó una mezcla para 80 reacciones (para 25 μ L de reacción final se colocó 200 μ M de DNTPs, 10X buffer de PCR, 2.5 mM de $MgCl_2$, 25 μ M del oligonucleótido, 2.5 U de *Taq* polimerasa y 9.65 de H_2O ddie). Una vez hecha la mezcla, se colocaron 24 μ L en tubos para PCR, luego se le agregó 100 ng de ADN de cada muestra. Después de la desnaturalización inicial se realizaron amplificaciones en un termociclador Perkin-Elmer 9700 programado para 30 s a 94°C, seguido de 45 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 3 min a 72 °C; con una extensión final de 7 min a 72 °C.

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con 0,3 μ g/mL bromuro de etidio y un buffer 1 X TBE (EDTA 2 mM, Tris-HCl 0,1 M y ácido bórico 0,1 M [pH 8,0]). Se usó 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) para estimar el tamaño de los amplicones.

Análisis de datos. Este análisis inició con la observación directa de las bandas que se obtuvieron en el gel de agarosa, las cuales se numeraron de acuerdo con su peso molecular y se asumió, que tales bandas amplificadas en los diferentes aislados eran idénticas si presentaban el mismo peso molecular. Se realizó una matriz de datos binarios (asignándose un valor numérico de 1 para asumirse la presencia y 0 para la ausencia) y se estimó la similitud genética mediante el índice de similitud de Nei (1978) ($H = 1 - \sum X_i^2$, donde H = similitud genética de la población y $\sum X_i$ es la frecuencia de los diferentes alelos en un determinado locus). Luego, con dicha matriz se realizó un dendrograma mediante el método aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA) del programa NTSYS-PC versión 2.0 (Rohlf, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El promedio obtenido del número de alelos fue de 12.5, de un total de 25. El 100% de los alelos obtenidos fueron polimórficos, el peso de los amplicones varió de 750 a 2,500 pb. Por otro lado, de 80 muestras de ADN analizadas, solo seis no amplificaron, por lo que fueron descartadas para del análisis. Así, la información de las 74 muestras amplificadas se colocó en una matriz para después poder generar el dendrograma, el cual sugiere la existencia de cuatro grupos (Fig. 1). Este comportamiento es similar a lo que ocurrió con aislados de *Zymoseptoria tritici* (antes *Mycosphaerella graminicola*) analizados por Castillo et al. (2010), quien encontró que, de un total de 126 aislados, 43 no generaron ninguna amplificación con ninguno de los 10 oligonucleótidos utilizados.

El grupo I, conformado por 17 aislados del estado de Colima y un aislado de Michoacán, en donde los aislados arml3m1c1 y p9c3ceteco fueron los más similares ya que su coeficiente genético fue de aproximadamente 0.93. De acuerdo con los resultados obtenidos por Hayden *et al.* (2005) y Carlier et al. (1996), que realizaron un análisis de la variabilidad genética mediante marcadores de RFLP y SSR respectivamente, en ambos casos encontraron bajos niveles de diferenciación entre las poblaciones analizadas a pesar de su separación geográfica; esto sugiere un limitado flujo de genes y que la diseminación puede atribuirse principalmente al movimiento de material vegetal infectado durante el establecimiento de las plantaciones de banano y/o una muy restringida dispersión de ascosporas. Lo anterior podría explicar la baja variabilidad genética observada entre algunos aislados de diferentes estados de la república, al agruparse a pesar de provenir de sitios muy alejados geográficamente (en el grupo IV del dendrograma se agruparon 17 aislados de Tabasco, 9 de Michoacán, 3 de Chiapas y 1 de Colima, en el grupo 3 se agruparon 15 de Chiapas, 7 de Michoacán, y 1 de Colima).

El patrón anterior se repite también en el grupo II que estuvo integrado por dos aislados del estado de Michoacán (egp78 y p3c2coah) y un aislado del estado de Tabasco (RemeC4), este último es el más diferente ya que su coeficiente genético fue de aproximadamente 0.48 a diferencia de los otros dos aislados que tuvieron 0.68. Mientras que en el grupo III, se encontraron 15 aislados de Chiapas, 7 de Michoacán y uno de Colima, de estos, los aislados cr6d y coahsapo, fueron los más distintos, ya que su coeficiente de variación fue de aproximadamente 0.58. Por último, el grupo IV, estuvo conformado principalmente por aislados de Tabasco (17), Michoacán (nueve), Chiapas (tres) y Colima (uno), de los cuales jaguarc1 y alegrec5 fueron los más parecidos ya que su coeficiente genético fue cercano a 0.95. También, en este grupo se

encontraron dos subgrupos, los aislados de rec1c3 y recv1c3, alegrec3 y recreoc3, al obtener un coeficiente de 0.95.

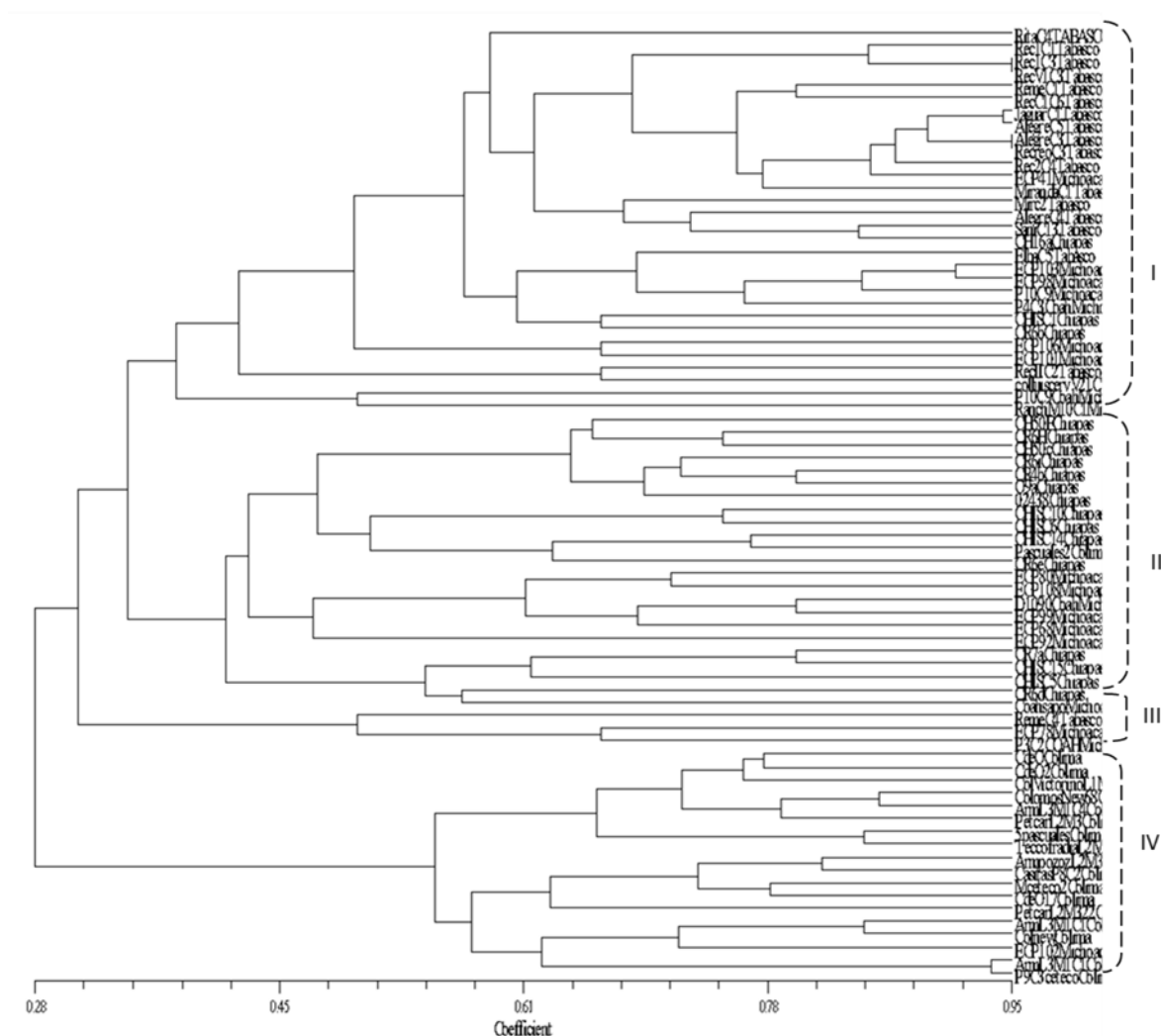


Figura 1. Análisis de similitud genética de 74 aislados de *P. fijiensis* provenientes de los estados de Colima, Michoacán, Tabasco y Chiapas. El análisis se basa en ISSR obtenidos a partir de dos oligonucleótidos para los locus ISSR809 e ISSR810.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que las poblaciones analizadas podrían dividirse en cuatro grupos genéticos claros, la mayoría circunscrito a áreas geográficas definidas; pero, también sugieren que existe un flujo génico limitado entre poblaciones, quizás este podría estar asociado al intercambio de material infectado entre zonas de cultivo, más que a dispersión a larga distancia de ascoporas.

REFERENCIAS

1. Carlier J, Lebrun MH, Zapater MF, Dubois C, Mourichon X. 1996. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 5: 499-510.
2. Castillo N, Cordo C, Simon MR. 2010. Molecular variability among isolates of *Mycosphaerella graminicola*, the causal agent of septoria tritici blotch, in Argentina. *Phytoparasitica* 38: 379-38.
3. Hayden HL, Carlier J, Aitken EAB. 2005. The genetic structure of Australian populations of *Mycosphaerella musicola* suggests restricted gene flow at the continental scale. *Phytopathology* 95: 489 - 498.
4. Leung H, Nelson RJ, Leach JE. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Advances in Plant Pathology* 10:157-205.
5. Manzo-Sánchez G, Orozco-Santos M, Islas-Flores I, Martínez-Bolaños L, Guzmán-González S, Leopardi-Verde CL, Canto-Canché B, 2019. Genetic variability of *Pseudocercospora fijiensis*, the black sigatoka pathogen of banana (*Musa* spp.) in Mexico. *Plant Pathology* 68: 513-522.
6. McDonald BA. 1997. The population genetics of fungi: Tools and techniques. *Phytopathology* 87: 444-453.
7. Rohlf DJ. 1997. NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0 Exeter Publ., Setauket. New York.
8. Stover RH. 1976. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. *Trop. Agric.* 53: 111-114.