

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	2
2.1	IMPORTANCIA ECONOMICA DE LA SIGATOKA NEGRA	2
2.1.1	LA SIGATOKA NEGRA EN MÉXICO	3
2.2	EL PATOGENO CAUSANTE DE LA SIGATOKA NEGRA	4
2.2.1	SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD DE LA SIGATOKA NEGRA	6
2.2.1.1	Síntomas según Fouré	7
2.2.2	DIVERSIDAD PATOGENICA	8
2.2.3	IDENTIFICACION MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	9
2.2.3.1	Identificación Morfológica	9
2.2.3.2	Identificación a nivel molecular	11
2.3	MÉTODOS DE CONTROL	11
2.4	EL ESTUDIO DEL CARIOTIPO EN HONGOS	13
3	MATERIAL Y METODOS	16
3.1	MATERIAL VEGETAL Y HONGOS	16
3.2	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>M. fijiensis</i>	17
3.2.1	EXTRACCION DE ADN	17
3.2.2	REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	18
3.3	PRUEBAS DE VIRULENCIA	21
3.3.1	PRODUCCION DE CONIDIOS	21
3.3.2	COLECTA DE CONIDIOS	21
3.3.3	CONTEO DE CONIDIOS	22
3.3.4	INOCULACION ARTIFICIAL DE PLANTAS DE "ENANO GIGANTE" UTILIZANDO DIFERENTES LINEAS DE <i>M. fijiensis</i>	22
3.4	OBTENCION DEL CARIOTIPO MOLECULAR	23
3.4.1	MÉTODO PARA LA ELABORACIÓN DE "PLUGS" DE MICELIO	23
3.4.2	MÉTODO PARA LA ELABORACIÓN DE "PLUGS" DE ESFEROPLASTOS	24
3.4.3	ELECTROFORESIS DE CAMPO PULSANTE	26
3.4.4	TINCION DEL GEL	27
3.5	ESTIMACION DEL TAMAÑO DEL GENOMA	28
3.6	COMPARACION ENTRE LINEAS	28
4	RESULTADOS	30
4.1	PRUEBAS DE VIRULENCIA	30
4.2	IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES	32
4.3	OBTENCION DEL CARIOTIPO MOLECULAR	33
4.3.1	ELABORACION DE "PLUGS" UTILIZANDO MICELIO	33
4.3.2	ELABORACION DE "PLUGS" UTILIZANDO ESFEROPLASTOS	34
4.4	RESULTADOS DE LA ELECTROFORESIS	34
4.4.1	CORRIDAS ELECTROFORÉTICAS UTILIZANDO "PLUGS" DE ESFEROPLASTOS	34
4.4.2	CORRIDAS ELECTROFORÉTICAS UTILIZANDO "PLUGS" DE MICELIO	35
4.5	CÁLCULO DEL NUMERO CROMOSOMICO Y DEL TAMAÑO DEL GENOMA	40
5	DISCUSION	41
5.1	PRUEBAS DE VIRULENCIA	41
5.2	OBTENCION DEL CARIOTIPO MOLECULAR	42
5.2.1	"PLUGS" DE MICELIO	42

5.2.2	"PLUGS" DE ESFEROPLASTOS.....	43
5.2.3	ELECTROFORESIS Y TINCION DE GELES	43
5.3	COMPARACIÓN ENTRE LINEAS.....	44
5.4	ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL GENOMA	46
6	CONCLUSIONES.....	47
7	PERSPECTIVAS	48
8	GLOSARIO	49
9	BIBLIOGRAFIA	51
10	ANEXOS	58
	ANEXO 1: DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CARIOTIPO Y DE ELECTROFORESIS	58
	ANEXO 2: IDENTIFICACIÓN POR METODOS MOLECULARES Y RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE ESTANDARIZACION	65
	IDENTIFICACIÓN POR METODOS MOLECULARES	65
	ANEXO 3: DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES PARA LA ESTANDARIZACION.....	75
	ANEXO 4: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	77

RESUMEN

La Sigatoka negra es una enfermedad foliar devastadora de los bananos y plátanos. En México se estima que el combate de esta enfermedad ocupa de 35 a 45% del total de costos de producción del cultivo. El patógeno causal es el ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* (MORELET).

En el presente trabajo se propuso obtener el cariotipo molecular de dos aislados diferentes de *M. fijiensis* determinando las condiciones adecuadas para ello y utilizando el sistema de electroforesis de campo pulsante CHEF (Contour-clamped Homogeneous Electric Field), y estimar del tamaño genómico de los mismos. Se eligieron aislados procedentes de diferentes Estados de la República y fueron inoculados a plantas sanas, determinándose el nivel de patogenicidad de cada uno. Posteriormente, se ensayaron dos metodologías para el aislamiento de los cromosomas. La primera fue la producción de esferoplastos por medio de un tratamiento enzimático, embebiéndolos posteriormente en bloques de agarosa o "plugs". La segunda fue la utilización de micelio molido y tratado con amortiguadores, y finalmente embebido en "plugs" de agarosa. En ambos casos se incubaron los "plugs" con proteinasa K. La segunda metodología permitió que se observaran bandas de ADN en los geles de electroforesis. Para encontrar las condiciones adecuadas para la preparación de los "plugs" de micelio, se hicieron variaciones en la edad del cultivo, método de molido y la cantidad de cultivo utilizada. Fueron ensayadas diferentes condiciones de electroforesis con el sistema CHEF, que permitieron separar los cromosomas de dos líneas de *M. fijiensis*. Se obtuvieron los cariotipo de ambos aislados, uno de alta virulencia procedente de Veracruz y otro de baja virulencia procedente de Colima. Se observaron 5 bandas en las muestras de Colima y 12 bandas en las de Veracruz, representando 7 y 14 cromosomas respectivamente. El tamaño del genoma calculado es de al menos 15 Mb para el aislado procedente de Colima y 28 Mb para el de Veracruz. Por lo tanto, los cariotipos moleculares de dichos aislados presentan polimorfismos, fenómeno que ha sido observado en otras especies de hongos.

PALABRAS CLAVE:

Sigatoka negra, Cariotipo molecular, electroforesis de campo pulsante, tamaño genómico.