

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN.	
1.1. Justificación	1
1.2. Objetivo General	2
1.3. Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Importancia económica de plátanos y bananos	4
2.2. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , agente causal de la Sigatoka negra.	5
2.3. Distribución geográfica de la Sigatoka negra	5
2.4. Patogenicidad de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	7
2.5. Control de la Sigatoka negra	9
2.5.1. Control químico	9
2.5.2. Otras estrategias para el control de la Sigatoka negra	9
2.6. Diversidad genética de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	10
2.7. Marcadores moleculares tipo microsatélites	12
2.7.1. Aislamiento de microsatélites a partir de diferentes métodos	13
2.7.2. Métodos Moleculares para Estudio de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	16
3. METODOS	18
3.1. Material biológico empleado	18
3.2. Obtención de las clonas con ADN de microsatélites de <i>M. fijiensis</i>	18
3.2.1. Extracción de ADN	19
3.2.1.1. Protocolo CTAB 5%	20
3.2.2. Determinación de la concentración de ADN	21
3.2.3. Digestión de ADN y ligación con adaptadores	21
3.2.4. Purificación de fragmentos de restricción ligados a adaptadores	22
3.2.5. Captura de fragmentos de restricción con sondas biotiniladas (Enriquecimiento)	22
3.2.6. Amplificación por PCR de fragmentos de ADN capturados utilizando un primer (21 mer)	24
3.2.7. Purificación de fragmentos de ADN mediante n-butanol	25
3.2.8. Ligación de fragmentos de ADN purificados al vector pGEM-T ^R	26
3.2.9. Transformación de células de <i>E. coli</i> competentes cepa JM109 con el vector pGEM-T ^R	26
3.3. Secuenciación de fragmentos de ADN que contienen microsatélites obtenidos en las clonas	27
3.3.1. Preparación de membranas.	28
3.3.2. Hibridación de membranas con sondas marcadas con $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP	30
3.3.3. Exposición de membranas y diferenciación de señales	31
3.3.4. Aislamiento del inserto para su secuenciación	32
3.3.5. Preparación de las muestras para su secuenciación	32
3.3.6. Secuenciación	32
3.4. Diseño de primers a partir de secuencias flanqueantes de microsatélites	33

en los fragmentos secuenciados	
3.4.1. Análisis de secuencias	33
3.4.2. Diseño y prueba de primers.	33
4. RESULTADOS	37
4.1. Obtención de las clonas con ADN de microsatélites de <i>M. fijiensis</i>.	37
4.1.1. Concentración de ADN.	37
4.1.2. Digestión - ligación de ADN genómico y purificación de los fragmentos de restricción.	37
4.1.3. Hibridación o enriquecimiento de los fragmentos de restricción utilizando sondas biotiniladas y la amplificación de los fragmentos por PCR utilizando un primer (21 mer).	38
4.1.4. Ligación de los fragmentos de ADN purificados con el vector pGEM-T ^R y transformación células de <i>E. coli</i> competentes (cepa JM109).	41
4.2. Secuenciación de fragmentos.	42
4.2.1. Escrutinio de las clonas del primer grupo de membranas.	42
4.2.2. Escrutinio de las clonas del segundo grupo de membranas.	44
4.3. Diseño de primers.	46
4.3.1. Prueba de primers diseñados.	47
5. DISCUSIÓN	50
6. CONCLUSIÓN	56
7. GLOSARIO	57
8. REFERNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9. ANEXOS	67
9.1. Técnicas llevadas a cabo mediante el uso de kits.	67
9.2. Secuencias de fragmentos de ADN de <i>M. fijiensis</i> que fueron empleadas para el diseño de primers.	71

RESUMEN

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* es el causante de la enfermedad Sigatoka negra del plátano y banano en el mundo y es genéticamente muy variable dependiendo de su origen geográfico, por lo que se ha sugerido el estudio de poblaciones a nivel regional y/o nacional de este patógeno. En este trabajo se generan por primera vez, iniciadores tipo microsatélites específicos para un locus (SSR) para líneas mexicanas de *M. fijiensis* y se llevó a cabo por el método de enriquecimiento con perlas magnéticas.

El objetivo del trabajo fue la obtención de iniciadores de microsatélites en aislados mexicanos de *M. fijiensis*. Para ello se obtuvieron clonas de fragmentos de ADN de 300 – 1000 pb, enriquecido con sondas sintéticas de microsatélites (CA)₁₀ o (GA)₁₀, se analizaron 192 clonas, 10 de ellas (5.2% de eficacia de enriquecimiento) hibridaron con las sondas de microsatélites marcadas con ³²P y se secuenciaron. Sólo cuatro de estas clonas mostraron microsatélites, dos de las cuales contienen fragmentos repetidos y las otras dos se utilizaron para el diseño de primers mediante el software Primer3.

De los pares de primers diseñados sólo uno de ellos:

5'- TGCAGCCGGTGAGTATAGGT -3'

5'- ATGACTTGTTGGGATTGCTT -3'

amplificó productos con apreciable diferencia de tamaño a partir de 8 ng de ADN de cada una de ocho diferentes líneas mexicanas de *M. fijiensis* y no amplificó en dos líneas mexicanas de *M. musicola* ni en una muestra de *Musa* spp. Esto sugiere que este par de primers detecta polimorfismos entre líneas mexicanas del patógeno y podría ser específico para *M. fijiensis*, por lo que podría también, ser una herramienta útil para el proyecto “Mapeo físico y genético de *Mycosphaerella fijiensis*”, trabajo que en un futuro puede colaborar en la prevención y/o protección de las plantaciones de plátano y banano.

PALABRAS CLAVE: *Mycosphaerella fijiensis*, microsatélites, Sigatoka negra, México, Plátano.