

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Problemática e importancia económica	3
2.2. Agente causal de la Sigatoka negra	4
2.2.1. <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	4
2.3. Sintomatología sobre la enfermedad	5
2.4. Control	6
2.5. Estudios sobre la Sigatoka negra	8
2.6. Enzimas de restricción	9
2.7. Electroforesis de campo pulsante en gel	10
2.7.1. Principio de la electroforesis de campo pulsante	11
2.7.2. Sistema CHEF	12
2.8. Marcadores de peso molecular	13
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVO	15
HIPÓTESIS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS	17
3.1. Material fúngico	17
3.2. Cultivo del hongo en medio líquido	17
3.3. Elaboración de “plugs” de micelio	18
3.4. Lavado con fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF)	19
3.5. Método de digestión con enzimas de restricción	19
3.5.1. Digestión con Eco RI y Not I	20
3.5.2. Digestión con Swa I	21
3.6. Separación de fragmentos utilizando Electroforesis de campo pulsante	22
3.7. Tinción del gel	22

3.8. Estimación del tamaño del genoma	22
4. RESULTADOS	24
4.1. Elaboración de “plugs” de micelio	24
4.2. Lavado con PMSF	24
4.3. Digestión con Eco RI	25
4.4. Digestión con Swa I	26
4.5. Digestión con Not I	29
5. DISCUSIONES	30
5.1. Elaboración de “plugs” de micelio	30
5.2. Lavado con PMSF	30
5.3. Determinación de las condiciones óptimas de digestión completa	31
5.4. Determinación de las condiciones electroforéticas óptimas para separar fragmentos de ADN	31
5.5. Digestión con Eco RI	32
5.6. Digestión con Swa I	33
5.7. Digestión con Not I	33
6. CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	41

RESUMEN

El cultivo de Plátano y Banano en nuestro país es una de las actividades económicas más importantes, esta actividad agrícola se encuentra amenazada principalmente por la enfermedad foliar denominada Sigatoka negra, que actualmente se encuentra distribuida en todas las regiones bananeras de nuestro país. El combate de esta enfermedad supera el 35 % de los costos de producción del cultivo. El patógeno causante de la Sigatoka negra es el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*.

Se han realizado diversos estudios para contrarrestar esta enfermedad, tanto en banano como en el patógeno que la causa, en el presente trabajo se propuso estimar el tamaño genómico de tres aislados diferentes de *M. fijiensis*. Para esto, los ADN genómicos (ADNg) de los aislados se sometieron a una digestión enzimática completa. Se probaron diferentes metodologías para incluir micelio del hongo en bloquecitos de agarosa (“plugs”), con el fin de que el ADNg no se dañara. Los “plugs” se incubaron en proteinasa K con el fin de romper las paredes del hongo y así exponer el ADNg del micelio a la acción de las enzimas de restricción seleccionadas. Posteriormente se estandarizó la técnica para eliminar la proteinasa K mediante lavados con fluoruro de fennilmetil sulfonilo (PMSF). Finalmente se estableció el protocolo para la digestión del ADNg contenido en los “plugs” con las enzimas Eco RI, Swa I y Not I. Para el análisis de las digestiones se utilizó un sistema de electroforesis de campo pulsante, CHEF MAPPER® (Contour-clamped Homogeneous Electric Field). Las pruebas con diferentes condiciones para la electroforesis con el sistema CHEF MAPPER®, permitieron separar fragmentos de ADN grandes producidos con las enzimas de restricción sobre los ADNg de las tres líneas de *M. fijiensis*.

El perfil de restricción reveló por lo menos 19 fragmentos para el aislado procedente del estado de Tabasco, 13 fragmentos para el aislado procedente del estado de Chiapas y 10 fragmentos para el estado de Veracruz con la enzima SwaI. Analizando los resultados se concluyó que existe diferencia en el perfil de restricción (polimorfismo) de los aislados seleccionados. El polimorfismo se observa también cuando se analizan los cromosomas intactos; nuestro trabajo muestra que el polimorfismo ocurre también a nivel de patrones de restricción (“fingerprinting”).