

# Extracción de ADN de *Micosphaerella fijiensis* proveniente de diferentes aislamientos colectados en Costa Rica

R. Buro Hernández <sup>1</sup>  
Claudia Zúñiga Vega <sup>2</sup>  
Jorge Madriz Muñoz <sup>3</sup>

## Palabras clave

*Micosphaerella fijiensis*, banano, Musa, ADN.

## Resumen

El hongo fitopatógeno *Micosphaerella fijiensis* constituye el organismo causal de la enfermedad conocida como sigatoka negra, la cual afecta considerablemente los cultivos de banano, al promover la pérdida general de tejido foliar. La agresividad diferencial observada por parte de dicho organismo, dependiendo de la región productora, permite suponer la existencia de razas o biotipos del patógeno, lo cual únicamente podrá ser corroborado mediante el empleo de técnicas moleculares. Se validó una metodología para la extracción del ácido

desoxirribonucleico (ADN) del hongo en mención, a partir de aislamientos provenientes de cinco fincas ubicadas en la Zona Atlántica y Norte de Costa Rica. La realización de las extracciones se ejecutó a destiempo en 5 bloques, con el fin de definir las variables involucradas en tal proceso. Los productos se visualizaron en un transiluminador ultravioleta luego de su separación por electroforesis en geles de agarosa. Las bandas obtenidas demostraron la presencia de ácidos nucleicos; no obstante, la cantidad de estos varió significativamente entre los bloques de extracción. El desarrollo de esta metodología permitió el establecimiento de una base de datos de ADN proveniente de los diferentes aislamientos analizados, que podrá ser empleada posteriormente en estudios que involucren marcadores moleculares.

- 1 Estudiante Carrera Ingeniería en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- 2 Académica Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: (czuniga@itcr.ac.cr).
- 3 Académico Escuela de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional. Costa Rica Correo electrónico:(jmadriz@samara-una).

## Introducción

El cultivo del banano se considera como el más difundido del mundo y reviste de gran importancia, especialmente para los países en desarrollo, por su impacto económico y cultural. Se le encuentra en regiones tropicales y subtropicales, y en condiciones naturales abarca una amplia distribución que incluye tierras cercanas a las costas, lagos, orillas de ríos y zonas selváticas. Este cultivo puede ser afectado por numerosos patógenos, los cuales pueden generar un alto porcentaje de pérdida de la producción potencial, produciendo inestabilidad a las empresas productoras. La rentabilidad del cultivo depende en alto grado del manejo integrado que se les dé al combate de las enfermedades (Ortiz *et al.*, 1999).

El hongo conocido como *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*, causante de la sigatoka negra, constituye una de las enfermedades más agresivas que afecta las plantaciones de banano, ocasionando pérdidas en la producción de hasta un 50% (Mourichon *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2001). En solo cuatro décadas se ha esparcido en todo el mundo y actualmente se encuentra en las regiones productoras de los trópicos húmedos. La metodología empleada para su control resulta difícil y costosa, ya que se ha intensificado el uso de fungicidas y el número de ciclos de aplicación de estos, lo cual genera un impacto negativo en el medio ambiente (Ortiz *et al.*, 1999).

La gran diseminación que ha tenido esta enfermedad en el mundo ha sido como resultado de las actividades humanas y del movimiento no regulado de material vegetal que se da entre los diferentes países. La resistencia y la agresividad diferencial desarrollada por el patógeno ante distintos productos suponen la existencia de biotipos o razas en la naturaleza; evidencia que solo se podría corroborar mediante el empleo de tecnologías moleculares, que permiten

estudiar las diferencias a nivel de su constitución genética.

En la última década, se ha estudiado el genoma de *M. fijiensis*, con el propósito de caracterizarlo con más detalle y definir, entre otros, aspectos como diversidad genética y diferencias en la virulencia de las diferentes procedencias. Johanson y Jeger (1993) usaron la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para distinguir entre *M. musicola* y *M. fijiensis*. Su trabajo consistió en diseñar cebadores específicos a partir de regiones variables del genoma asociados con cebadores provenientes de secuencias conservadas del ADN ribosomal de los hongos. Carlier *et al.* (1994), utilizando los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), también lograron diferenciar las especies mencionadas. Lo anterior se consideró un gran aporte, porque permitió identificar de una forma rápida y segura estas especies, lo cual facilitará los estudios epidemiológicos y los programas de monitoreo en áreas de cultivo.

Posteriormente, estos resultados fueron apoyados por Neu *et al.* (1999), quienes por medio del uso de los microsátélites encontraron niveles de variación altos en el sureste de Asia, considerada la región del origen del banano. También detectaron que la diversidad genética estaba reducida fuertemente en todas las otras regiones en donde se produce este cultivo. Lo que sugiere que la migración del patógeno entre los continentes es rara y que durante su dispersión en el mundo ocurrió un efecto del fundador.

Por su parte, Müller y colaboradores (2000), con esta misma técnica, estudiaron diversas muestras de banano de Nigeria y detectaron variabilidad genética entre los individuos provenientes de localidades muy distantes, así como entre los aislamientos de la misma

localidad y de la misma lesión. Estos hallazgos facilitarán la comprensión sobre la dinámica de las poblaciones de la sigatoka negra, así como sobre la distribución de sus genotipos.

Paralelamente, se desarrollaron pruebas de enzimas conjugadas inmunoabsorbentes (ELISA) que permitirán detectar la presencia de sigatoka en las hojas de banano durante las primeras etapas de la infección (Molina *et al.* 2001).

El objetivo general de esta investigación consistió en desarrollar y estandarizar un protocolo de extracción de ADN del hongo fitopatógeno *M. fijiensis* y establecer una base de datos de ADN a partir de aislamientos de este, para futuros estudios de caracterización molecular.

### El cultivo del banano

Actualmente, la producción comercial de esta musácea, estimada globalmente en 60 millones de toneladas métricas, está fundamentalmente orientada al comercio de exportación de fruta fresca. De dicha producción, el 44% corresponde a los países de América Latina, en donde Ecuador se consolida como el mayor exportador del mundo seguido por Costa Rica (Ortiz *et al.*, 1999).

En nuestro país, el área cultivada de banano comprende aproximadamente 50 000 hectáreas, pertenecientes a compañías transnacionales o a productores asociados y se distribuye en los siguientes cantones localizados en la Zona Atlántica y Pacífico Sur: Corredores, Golfito, Osa, Guácimo, Limón, Matina, Pococí, Sarapiquí, Siquirres y Talamanca (Soto, 1992). La producción se estima superior a las 100 000 000 cajas anuales, lo cual representa más del 30% de su estrada en divisas (Guzmán y Romero, 1995). La industria bananera, además de consolidarse como una de las actividades que mayores divisas generan a un

número importante de países en desarrollo, es considerada una de las principales fuentes generadoras de trabajo, en los países donde dicha actividad se desarrolla.

La enfermedad denominada sigatoka negra constituye la principal limitación productiva de este cultivo en la actualidad y es ocasionada por un hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* (Ortiz *et al.*, 1999). Este patógeno produce conidios y ascósporas, ambos infecciosos, los cuales se forman en condiciones de alta humedad y son dispersados por la lluvia y los sistemas de irrigación.

Los síntomas iniciales consisten en pequeños puntos oscuros menores de 0,25 mm de diámetro localizados en el envés de la hoja, que se convierten en estrías de color pardo rojizo, visibles solo en este mismo lado. Conforme las estrías se alargan, a lo largo de las venas, se van tornando de color negro, manifestándose entonces en el haz. Al crecer las estrías, se transforman en manchas oblongas rodeadas de un borde pardo claro y acuoso (Ortiz *et al.*, 1999). Posteriormente, el centro negro de la lesión se hunde ligeramente y el borde se hace más pronunciado. Puede presentarse un tenue amarillamiento del tejido alrededor de la lesión y las lesiones coalescen formando grandes manchas negras. Después, el centro de la lesión se seca, se torna de color gris y aumenta la depresión, rodeándose la lesión con un borde negro bien definido. Si se presenta una amplia densidad de lesiones estas se unen, la hoja se torna negra y muere tres o cuatro semanas después de aparecer los síntomas (González, 1987).

La pérdida de área foliar, debido a condiciones de fuerte infección en la planta, ocasiona la reducción del área fotosintética y el vigor de esta, lo cual tiene efectos severos en el crecimiento, producción y calidad de la fruta, tales

como retardos en la madurez fisiológica normal y generación de racimos más pequeños de lo usual o con dedos individuales pequeños y angulares con madurez prematura (González, 1987).

Uno de los objetivos principales de los programas de mejoramiento consiste en la generación de híbridos de banano con buenas características comerciales y que sean resistentes a la sigatoka negra. Recientemente, algunos proyectos se han orientado hacia el uso de la ingeniería genética para buscar resistencia a hongos, así como realizar estudios de origen y distribución de razas de *Mycosphaerella fijiensis* resistentes a fungicidas o con diferentes niveles de agresividad (Ortiz *et al.*, 1999). Los marcadores moleculares se consideran como una de las herramientas más poderosas, tanto en el mejoramiento genético como en la identificación de individuos y en estudios básicos de localización, aislamiento y caracterización de genes (Mendoza y Simpson, 1996).

## Materiales y métodos

### Establecimiento de cultivos monoascospóricos

Esta etapa se desarrolló en su mayor parte en el Laboratorio de Fitopatología de la Corporación Bananera Nacional en La Rita de Guápiles y en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional. Se tomaron muestras de un total de 5 fincas bananeras denominadas La Rita, Río Frío, Escuela de Agronomía de la Región Tropical Húmeda (EARTH), Banagro y C. Propalca, ubicadas, respectivamente, en Guápiles, Sarapiquí y Guácimo.

Las muestras provenían de tejido foliar necrosado con síntomas característicos de *M. fijiensis*, el cual se trasladó a

condiciones de laboratorio dentro de bolsas de papel. Se permitió que el tejido secase y luego se procedió a cortarlo en forma de círculos de aproximadamente 1,8 a 2 cm de diámetro de modo que cada uno mostrara lesiones esporulantes con una alta concentración de peritecios. Se engraparon de 4 a 5 círculos en segmentos de papel *bond* de 10 cm de ancho por 12 cm de largo, identificando en forma adecuada su lugar de procedencia.

El sistema papel-tejido se incubó por 24 horas en cámaras húmedas compuestas por cajas plásticas provistas de papel toalla ligeramente humedecido, asegurándose de que este último no entrase en contacto con el material. Luego de su incubación, el sistema se introdujo por 5 minutos en un vaso de precipitados que contenía agua destilada, con el objetivo de hidratar los peritecios; transcurrido este tiempo se extrajo este y se colocó sobre papel toalla seco para eliminar el exceso de humedad, con el cuidado de que los círculos de tejido quedasen expuestos.

Seguidamente, se procedió a realizar la descarga de las ascósporas por lo que se situaron los segmentos de papel con el material sobre placas petri de 100 x 15 mm con agar-agua al 3% por un tiempo cercano a los 30 minutos, de forma tal que el tejido estuviese en dirección al medio, pero sin entrar en contacto con este. Durante dicho tiempo se ubicaron con un marcador indeleble las zonas de descarga, las cuales se corroboraron luego de retirar el material y visualizar las placas contra la luz.

Las placas se sellaron con papel parafilm y se expusieron durante 24 horas a condiciones de luz (12 horas) y temperatura (26 °C) normales para que se iniciara el crecimiento del tubo germinativo de las ascósporas. Posteriormente, en condiciones de cámara de transferencia y por medio de un estereoscopio, se observaron las áreas de

descarga. Se enfocaron las ascósporas pertenecientes al patógeno de interés, se extrajeron con la ayuda de una aguja fina y se colocaron uniformemente distribuidas en un medio Mycophil Agar contenido en placas petri de 100 x 15 mm (10 ascósporas por placa).

Las placas permanecieron en una incubadora con una temperatura regulada de 26 °C y oscuridad total durante 7 días para favorecer el crecimiento de las ascósporas; nuevamente se trasladaron a la cámara de transferencia, en donde se transfirió individualmente cada colonia desarrollada a placas petri de 60 x 15 mm con *Mycophil Agar*. Las placas se mantuvieron dentro de una incubadora en las mismas condiciones descritas anteriormente, con lo cual se favoreció el crecimiento de las colonias. Finalmente, se obtuvo un número variable de cultivos por finca dependiendo del número de ascósporas descargadas inicialmente: 17 colonias de finca La Rita, 10 colonias de Río Frío, 30 colonias pertenecientes a la EARTH y 29 y 22 colonias respectivamente para las fincas Banagro y C. Propalca.

### Extracción de ADN

Esta parte del proceso se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional. El protocolo utilizado se basó en el propuesto por Cenis (1992), para la extracción rápida de ADN fúngico. Se eligieron 10 colonias por finca, basándose en diferencias morfológicas distintivas a simple vista, tales como forma, coloración y tamaño de estas. Estas colonias presentaban al menos 2 semanas de crecimiento luego de su transferencia a un medio individual.

Dentro de una cámara de transferencia se inocularon algunas hifas de cada colonia (con micelio bien desarrollado), por medio de una asa micológica en tubos

de microcentrífuga de 1,5 mL que contenían 500 µL de medio PD (papa-dextrosa) para un total de 10 tubos por colonia seleccionada. El cultivo permaneció en crecimiento a temperatura ambiente con agitación continua en un agitador orbital a 1500 rpm por aproximadamente 10 días.

Posteriormente, se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 13 000 rpm para depositar en el fondo el micelio desarrollado. Se eliminó el sobrenadante, se añadieron 500 µL del *buffer* alcalino TE para lavar el micelio y se sometieron los tubos a agitación en un vortex durante 1 minuto. Luego se centrifugó nuevamente por 10 minutos. Se decantó el TE y se agregaron 300 µL del *buffer* de extracción (200 mM Tris HCl pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM de EDTA, 0,51 % SDS), el cual proporciona un medio salino y alcalino para lisar las células, inhibiendo la acción de enzimas degradadoras. Después, los tubos se colocaron sobre un agitador orbital a 1 500 rpm por 40 minutos. Dicho tiempo se determinó luego de evaluar distintos intervalos (10, 20 y 30 minutos ) y de observar la respuesta del material en la etapa siguiente (maceración).

El micelio se maceró por medio de un pistilo insertado a un *potter* eléctrico a 200 rpm por 1 minuto. Se añadieron (dentro de una cámara de extracción de gases) 500 µL de fenol equilibrado con Tris a cada tubo y se centrifugaron por 5 minutos a 13 000 rpm. La fase acuosa superior obtenida se extrajo con una micropipeta y se trasladó a nuevos tubos de microcentrífuga estériles, siempre empleando la cámara de extracción de gases. Para precipitar los ácidos nucleicos se adicionó 250 µL de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 500 µL de isopropanol y se colocaron estos a -20 °C por 20 minutos.

Finalmente, los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 13 000 rpm para precipitar los ácidos nucleicos y obtener

un botón compuesto por estos, se les agregó 50  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% y se centrifugaron de nuevo por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó los tubos abiertos por algunos minutos para facilitar la evaporación del alcohol de la superficie del botón obtenido. Este último se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de TE y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Las 10 soluciones con el botón de ácidos nucleicos resuspendido en TE pertenecientes a un mismo cultivo se unieron en un solo tubo con la ayuda de una micropipeta con el fin de concentrar a 10X la cantidad de tales ácidos presentes. Luego, estos se centrifugaron por 15 minutos a 13 000 rpm y se les eliminó el sobrenadante, obteniéndose un botón nuevamente, el cual fue resuspendido en 50 ml de TE. Estos se sometieron luego a un tratamiento con la enzima ARNasa (1,25  $\mu\text{L}$  de ARNasa por cada 50  $\mu\text{L}$  de TE añadido, a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos) para degradar las moléculas de ARN existentes y asegurar la pureza del ADN obtenido.

Es importante resaltar que la extracción del ADN de las diferentes colonias, agrupadas en un total de 500 tubos de microcentrífuga (10 por colonia), se ejecutó a destiempo en 5 diferentes bloques compuestos de cien tubos cada uno, con el objetivo de que se pudieran definir las variables involucradas y de esta forma se pudiera establecer y estandarizar el protocolo de extracción de ADN de *M. fijiensis*.

### **Electroforesis de las muestras en geles de agarosa**

Después de la realización de los diferentes bloques de extracción, las soluciones de ácidos nucleicos se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa, con la finalidad de determinar la presencia de ADN y estimar indirectamente la eficiencia de la extracción de este. Se prepararon

geles de agarosa al 1% en TBE 1X; ambos componentes se calentaron dentro de un *beaker* en un horno microondas hasta la obtención de una solución con total transparencia (aproximadamente 30 segundos después), la cual luego se dejó enfriando hasta que alcanzó una temperatura cercana a los  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lo que permitió la adición de 1  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (500ng/ $\mu\text{L}$ ), un potente mutagénico que emite fluorescencia al exponerse a luz ultravioleta.

Posteriormente, la solución de agarosa se vertió en una bandeja para electroforesis y se insertaron los peines adecuados. Luego de su solidificación, el gel se cubrió con *buffer* TBE 1X y se retiraron los peines con extremo cuidado. Se prepararon las muestras para colocarlas en los diferentes pocillos del gel compuestas por 6 ml (5  $\mu\text{L}$  de la muestra y 1 $\mu\text{L}$  del *buffer* de carga conformado por 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de azul de xilencianol y 30% de glicerol) y se depositaron en los sitios previstos para estas. Se corrieron en el gel por espacio de 10 minutos a 70 voltios. Los productos de la extracción se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron empleando para ello una cámara con película Polaroid 667.

## **Resultados**

### **Establecimiento de cultivos monoascospóricos**

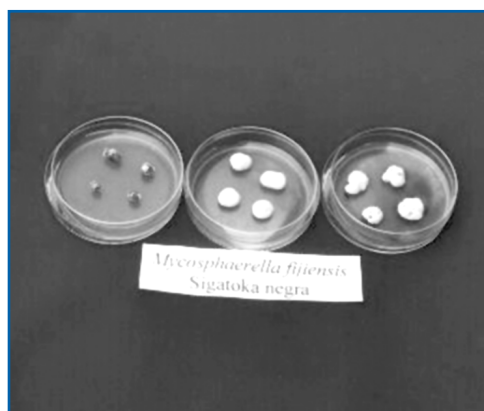
Los cultivos monoascospóricos (provenientes de una ascóspora individual) constituyen verdaderas unidades genéticas aisladas, ya que en el proceso de formación de las ascósporas se experimentan una serie de divisiones celulares meióticas, las cuales se caracterizan por dar como resultado productos con variabilidad genética entre sí. Lo anterior justificó el establecimiento de numerosos cultivos del hongo en

estudio por finca muestreada aunque las ascósporas utilizadas sean provenientes de un mismo ascocarpo.

Dentro de las colonias desarrolladas, se observaron diferencias morfológicas considerables relacionadas con su tamaño y forma, sin descartarse la posibilidad de que estas se presentaron inclusive dentro de ascósporas provenientes del mismo asco.

También, con base en las observaciones realizadas, se determinó que, como parte del desarrollo normal de las colonias, estas experimentan tres fases en las que presentan coloraciones de micelio diferentes (Figura 1): en la fase de desarrollo inicial poseen una coloración grisácea, en la fase intermedia el micelio se torna blancuzco y en la fase final, la coloración es de un rosado tenue. En la primera etapa el micelio desarrollado es escaso, contrariamente a lo que se observa en las dos siguientes.

De igual manera, se observó que durante la formación de las colonias surgió inicialmente una región negruzca de alta dureza que creció conforme la colonia se desarrolló; posteriormente, dicha región fue cubierta por el micelio.



**Figura 1**  
**Diferencias en la coloración del micelio durante el proceso de desarrollo de las colonias monoascospóricas de *M. fijiensis*.**

## Extracción de ADN

Inicialmente, se determinó que el subcultivo de micelio fúngico en medio PDA, a partir del cual se realizó la extracción de ácidos nucleicos, debe permanecer en crecimiento por un lapso entre los 7 y los 10 días, ya que con un menor tiempo el crecimiento fue reducido, lo cual no es conveniente en vista de la necesidad de disponer de una cantidad de material importante para realizar la extracción. Contrariamente, en un lapso superior se favoreció la formación de agregados de dureza considerable difíciles de macerar, similares a los observados durante el establecimiento de las colonias; ambas situaciones dieron como resultado un empobrecimiento del proceso de extracción, debido a la falta de material disponible a partir del cual realizar la extracción.

En vista del desarrollo precoz de pequeños agregados en algunos cultivos, se determinó cualitativamente el tiempo óptimo de permanencia del material en el *buffer* de extracción (40 minutos), valorando la facilidad con que la maceración se podía realizar después. Con los otros intervalos evaluados, la maceración no fue satisfactoria, ya que solo se fragmentaban los agregados sin ser verdaderamente macerados. La importancia de una buena maceración radica en que con esta se expone un mayor número de material celular, incluyendo los ácidos nucleicos que podrán ser extraídos posteriormente.

Previendo la posible interferencia durante la extracción de proteínas, polisacáridos y lípidos asociados con el material, y con el fin de garantizar la pureza del ADN obtenido, se empleó fenol equilibrado con Tris, que tiene la propiedad de extraer tales macromoléculas, que contribuyen a la obtención de ácidos nucleicos poco puros, no recomendables de emplear en amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) o en otras técnicas

de marcadores moleculares. La pureza de los productos obtenidos podría ser verificada mediante el análisis de estos en un cuantificador programable de ácidos nucleicos.

El botón obtenido correspondiente a los ácidos nucleicos presentó diferencias considerables de tamaño para todos los tubos; no obstante, se observó una coloración blanquizca típica en todos ellos, lo cual es característico de la presencia de impurezas como sales. En vista de lo anterior, se les realizó un lavado con etanol al 70%, y aunque la coloración se redujo, siempre resultó evidente, por lo que es necesario realizar más enjuagues con la misma sustancia para eliminar una mayor cantidad de sales y asegurar la pureza del producto.

Como parte del método extracción, se decidió realizar un tratamiento con la enzima ARNasa, para asegurar la única presencia de ADN fúngico concentrado; aunque un modo de comprobar lo anterior consistiría en someter las soluciones finales a un análisis de cuantificación de ácidos nucleicos, en donde es posible identificar la presencia de ARN hasta en el orden de los picogramos (pg).

Se consideró necesario, para lograr una concentración mayor de ADN, realizar 10 repeticiones para cada aislamiento, para que una vez aislado el material presente en estas se pudiera concentrar, permitiendo así el uso posterior en análisis moleculares sin tener que recurrir nuevamente a la extracción de este.

El almacenamiento del ADN se realizó empleando para ello TE como medio de conservación. Este *buffer* se prefirió en vista de su condición alcalina que preserva la estabilidad de las moléculas almacenadas y porque dificulta la libre actividad de las enzimas degradadoras del ADN.

El almacenamiento final de la ADNteca completa se ejecutó a temperaturas de -70 °C, contrariamente a las utilizadas conforme transcurría el desarrollo del proyecto (-20 °C); para preservar el ácido nucleico extraído y protegerlo de la degradación enzimática.

La visualización del gel electroforético para el supuesto ADN concentrado de los 50 aislamientos analizados mostró diferencias importantes con relación a la cantidad de ADN extraído por aislamiento (Cuadro 1).

**Cuadro 1**  
**Resultados de la electroforesis en gel de agarosa de extracciones**  
**de ADN de *M. fijiensis* de 50 aislamientos**  
**(Laboratorio de Biología Molecular, UNA. 2001)**

Número de aislamientos	Finca de procedencia	Presencia de bandas	Calidad de la banda
7	1 E, 4 P, 2 B	+	Intenso color y grosor considerable
15	4 P, 4 B, 5 E, 2 R	+	Color menos intenso y grosor considerable
12	3 E, 4 B, 2 F, 3R	+	Notable color y poco grosor
5	2 P, 3 F	+	Ligeramente visibles y poco gruesas
11	5 R, 5 F, 1 E	-	-

Nota: R= La Rita, F= Río Frío, E= EARTH, B= Banagro, P= C. Propalca.



Los resultados observados mostraron que el proceso de extracción empleado fue desigualmente eficiente, pues aunque fue posible extraer ADN en la mayoría de los casos, la cantidad presente varió entre aislamientos. El análisis de la electroforesis revela datos satisfactorios, puesto que demuestran que la extracción de ADN del hongo *M. fijiensis* es posible realizarla mediante el protocolo valorado, aunque la cantidad de ADN obtenida dependa de múltiples factores como los antes mencionados.

Como se observa en el Cuadro 1, los aislamientos de una misma finca presentaron comportamientos diferentes, aunque los generados por las fincas Banagro, C. Propalca y EARTH, tendieron a dar los mayores rendimientos de extracción. La cantidad de ADN generada parece no estar ligada con alguna finca determinada, sino con el bloque de extracción del cual formó parte.

## Discusión

### Establecimiento de cultivos monoascospóricos

Una posible explicación para la presencia de la región negruzca dura observada durante la formación de las colonias podría ser por la pared celular rígida que rodea a las células que conforman esta región, que poseen una cantidad alta de quitina, un azúcar nitrogenado que confiere dureza y que es muy resistente.

La diversidad en la morfología de las colonias establecidas, al igual que las diferencias relacionadas con la rapidez con la que estas se desarrollan dentro de un medio de cultivo o la capacidad para colonizar este, son características determinadas por su genoma. Asimismo, tal variabilidad puede relacionarse con la agresividad diferencial que parece tener *M. fijiensis*

cuando se comparan numerosas regiones con la alta incidencia de la enfermedad. No obstante, lo anterior puede ser solo determinado con el análisis en el ámbito molecular de sus unidades génicas.

El establecimiento de las colonias monoascospóricas de *M. fijiensis* constituye un proceso que requiere de entrenamiento, en vista de la laboriosidad de este y de la dificultad que posee la manipulación de ascósporas individuales. La presencia de esporas de otros hongos como productos de la descarga inducida en lesiones foliares es frecuente, por lo que la identificación y diferenciación morfológica de las ascósporas pertenecientes a *M. fijiensis* es imprescindible.

Las diferencias morfológicas observadas entre las colonias monoascospóricas de *M. fijiensis* están determinadas por la variabilidad existente en las ascósporas de las cuales provienen. El proceso de desarrollo normal de las colonias monoascospóricas incluye cambios en la coloración del micelio, que parte de un gris claro hacia el blanco y por último un rosado tenue. Las colonias de *M. fijiensis* están constituidas por dos partes: una región negruzca de mayor tamaño y de alta dureza que se desarrolla primero y el micelio propiamente.

### Extracción de ADN

Las diferencias observadas durante la extracción del ADN pudieron ser ocasionadas, en parte, por un desigual crecimiento de los aislamientos subcultivados cuando fueron sometidos a la extracción, en donde la disponibilidad de material variaba. Otro factor que pudo influir en esos resultados fue la presencia de agregados negruzcos en algunos de los tubos de varios aislamientos, que dificultaban su maceración, lo que repercutió en una obtención baja de ADN.

Estas razones pueden aplicarse también en el caso de los aislamientos en que no se observó presencia de ADN, pero, además,

no puede descartarse la posibilidad de que sí hubo extracción del ácido nucleico en tales casos, pero que enzimas ADNasas exógenas hayan degradado el material presente en estos. Otra posible explicación consiste en que las muestras contenían ADN, pero en bajas concentraciones, por lo que al tomar solo 5uL de la solución para realizar la electroforesis, este no pudo ser detectado en esta por su baja presencia.

La cantidad de ADN generada parece no estar ligada con alguna finca determinada, sino con el bloque de extracción del cual formó parte. Esto es importante ya que no se puede establecer una correlación entre la cantidad de ADN obtenida y la incidencia de la enfermedad por finca, lo que sería una posible prueba de la existencia de biotipos del patógeno. Sin embargo, esto solo podrá establecerse posteriormente con marcadores moleculares.

La extracción de ADN de *M. fijiensis* debe realizarse en subcultivos con un tiempo de crecimiento entre los 7 y 10 días, para garantizar un desarrollo óptimo que permita la posterior extracción. El tiempo de permanencia del material en el *buffer* de extracción influye sustancialmente en la facilidad con que se realiza la maceración de este. Para efectos de cuantificar en una forma rápida el ADN, se puede utilizar la electroforesis en geles de agarosa.

La extracción de ADN de *M. fijiensis* puede realizarse mediante el protocolo establecido, aunque es importante el control de ciertos factores que influyen en la cantidad de ADN obtenido.

La extracción de ADN de *M. fijiensis* es el primer paso para continuar con las técnicas de marcadores moleculares, que facilitarán la ampliación de los estudios que existen sobre el genoma del hongo, la composición de sus poblaciones y su diversidad genética.

Esta información permitirá el desarrollo de estrategias relacionadas con la resistencia a enfermedades y el manejo integrado de los cultivos.

## Agradecimientos

Al personal del Laboratorio de Fitopatología de CORBANA, M.Sc. Mauricio Guzmán e Ing. Ricardo Villalta y al Dr. Jorge Sandoval, por brindar la capacitación para el establecimiento de los cultivos del hongo. Al Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por proporcionar parte del financiamiento para esta investigación.

## Literatura citada

- Carlier, J.; Mourichon, X.; González de León, D.; Zapater, M.F.; Lebrun, M.H. 1994. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot disease. *Phytopathology* 84: 751-756.
- Cenis, J. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20 (9):2380.
- González, M. 1987. Enfermedades del cultivo del banano. Oficina de Publicaciones de la UCR. San José, Costa Rica. 110 pp.
- Guzmán, M.; Romero, C. 1995. Dirección de Investigaciones y Servicios Agrícolas. En: Informe Anual 1995. CORBANA. Ed. Gráficas S. A., San José, Costa Rica. pp. 57-59.
- Johanson, A.; Jeger, M. J. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycol.Res.* 97(6): 670-674.
- Mendoza, A; Simpson, H. 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. *Avance y perspectiva.* 16:53-57.
- Molina, C.; Kaemmer, D.; Aponte, S.; Weising, K.; Kahl, G. 2001. Microsatellite markers for the fungal banana pathogen

- Mycosphaerella musicola*. Molecular Ecology Notes 1. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00051.x>
- Mourichon, X.; Carlier, I.; Fouré, E. 1997. Enfermedades de Sigatoka: Raya negra de la hoja (Sigatoka negra) y enfermedad de Sigatoka (Sigatoka Amarilla). Enfermedades de la Musa. Hoja divulgativa N.º 8. Red Nacional para el mejoramiento del Banano y el Plátano. Parc Scientifique Agropolis II, Francia.
- Müller, R.; Pasberg-Gauhl, C; Gauhl, F.; Kaemmer; Kahl, G. 2000. INFOMUSA 4(1):9-10.
- Neu, C.; Kaemmer, D.; Kahl, G.; Fischer, D.; Weising, K. 1999. Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. Molecular Ecology 8: 523-525.
- Ortiz, R; López, A; Ponchner, S; Segura, A. 1999. El cultivo del banano. EUNED. San José, Costa Rica. pp. 215.
- Soto, M. 1992. Banano, cultivo y comercialización. 2.ª ed. Litografía e Imprenta Lil. Tibás, Costa Rica. pp. 784.