

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA



OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

DE *Mycosphaerella fijiensis*

CORPORACIÓN BANANERA NACIONAL S.A



XIOMARA AGUILAR RIVERA

CARTAGO, 2006

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA



OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

DE *Mycosphaerella fijiensis*

CORPORACIÓN BANANERA NACIONAL S.A



XIOMARA AGUILAR RIVERA

CARTAGO, 2006

OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

DE *Mycosphaerella fijiensis*

Resumen

Costa Rica constituye uno de los mayores productores de banano a nivel internacional, sin embargo la empresa bananera ha venido decayendo en los últimos años producto de las innumerables plagas, el surgimiento de nuevas enfermedades, las trabas arancelarias y no arancelarias, factores que han aumentado los costos de producción.

Una de las mayores plagas que afecta el cultivo del banano en Costa Rica corresponde a la enfermedad causado por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis*, llamada Sigatoka Negra. En el presente trabajo se muestra la optimización del protocolo de extracción de ADN de *Mycosphaerella fijiensis*.

En la investigación se evaluaron tres tratamientos de cultivo distintos (medio de cultivo sólido, medio de cultivo sólido con filtro y medio de cultivo líquido), seis cantidades de buffer de extracción (900 µl con carbón activado, 900 µl sin carbón activado, 300 µl, 600 µl, 1200 µl y 1500 µl) y la validación del uso del carbón activado durante el proceso de extracción de ADN para mejorar la amplificación de las pruebas moleculares. También se evaluó el rendimiento en la producción de biomasa del hongo de los tratamientos de cultivo empleados.

De los tratamientos que se evaluaron el que mejores resultados mostró fue el tratamiento con medio de cultivo líquido con la cantidad de 300 µl de buffer de extracción. Por medio de las pruebas de amplificación se pudo demostrar que el uso de carbón activado durante el proceso de extracción mejora significativamente los resultados que se obtienen.

En la prueba de rendimiento en la producción de biomasa se obtuvo que el medio semisólido con filtro, así como el medio de cultivo líquido producen mayor cantidad de micelio.

OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Mycosphaerella fijiensis*

Abstract

Costa Rica is one of the biggest producers of banana, but the banana production has decreased in the last years because of the endless pests, the appearance of new sicknesses, arancels and no arancels blocks, factors that have increased the production costs.

One of the biggest pest that affects the banana culture in Costa Rica is the sickness caused by the ascomicet fungus *Mycosphaerella fijiensis*, named Sigatoka Negra. The present job shows the optimization of the protocol of DNA extraction of *Mycosphaerella fijiensis*.

In the research three treatment of different mediums were evaluated (solid medium, solid medium with filter and liquid medium), six different quantities of extraction buffer (900 μ l with activated charcoal, 900 μ l with out activated charcoal, 300 μ l, 600 μ l, 1200 μ l y 1500 μ l) and the validation of the use of activated charcoal during the DNA extraction process in order to improve the results of the amplification in the molecular probes. Also the investigation evaluated the production of biomass of the fungus of the three treatments tested.

Of the treatments evaluated the one that showed the best results was the treatment with liquid medium with the quantity of 300 μ l of extraction buffer. By the results obtained in the amplification tests we demonstrated that the usage of activated charcoal during DNA extraction improves the results that can be obtain.

In the test that evaluated the production of biomass of the fungus the treatment with liquid medium and the treatment with solid medium plus filter produced the high quantity of mycelium.

**OPTIMIZACION DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN
DE *Mycosphaerella fijiensis***

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica por Xiomara Aguilar Rivera
como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Msc. Vladimir Villalba V.
Profesor Asesor-ITCR**

**PhD. Jorge Sandoval F,
Asesor- Empresa**

**MSc. Claudia Zúñiga V.,
Lectora**

DEDICATORIA

*A Dios y a mis padres, los
pilares más importante
de mi vida.*

Agradecimientos

Primero que nada agradezco a Dios la oportunidad que me dio de vivir y poder recibir las bendiciones tan grandes que a derramado en mi vida, agradezco a la Virgen María por estar siempre a mi lado.

Agradezco a mis padres por todo lo que han hecho por mi, si no fuera por su esfuerzo, amor y dedicación no habría podido llegar a la meta que alcanzo hoy, los quiero mucho. Mil gracias a toda mi familia, muy especialmente a mi hermano y a mi Tía Nelly.

Al personal del Instituto Tecnológico de Costa Rica y a la Corporación Bananera Nacional por haberme permitido desarrollar mis estudios de bachillerato en sus instalaciones y estar siempre anuentes a colaborar en todo lo que pudieran.

Gracias a la Sra. Janet Campos y a su padre Sr. Fabio Campos por recomendarme y permitir que desarrollará mi investigación en CORBANA, sitio de gran prestigio.

Agradezco al Ingeniero Olman Quirós por toda la ayuda brindaba para poder llevar a cabo la investigación, a mis asesores Msc. Vladimir Villalba, Msc. Claudia Zúñiga y al Dr. Jorge Sandoval, así como a los ingenieros Fabio Blanco y Mauricio Guzmán, por brindarme su valiosa colaboración y apoyo durante la realización del proyecto.

Gracias a los grandes amigos que encontré en CORBANA, muy especialmente a Donny, Fito, Yenny, Rogelio, Pedro, Doña Sofi, Roberto y Juan quienes colaboraron en la realización de la investigación.

De corazón quisiera extenuar mi más grato agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma colaboraron para que pudiera culminar esta meta tan importante en mi vida profesional.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
El cultivo del banano.....	6
Características generales del cultivo del banano.....	6
Colecciones de recursos fitogenéticos de banano.....	7
El mejoramiento genético de <i>Musa sp.</i>	8
La enfermedad de Sigatoka Negra.....	9
Origen de la enfermedad.....	9
Síntomas de la enfermedad.....	10
Aspectos epidemiológicos de la enfermedad.....	11
Dispersión de <i>M. fijiensis</i>	12
Condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad.....	12
Control de la enfermedad.....	13
Siembra de variedades resistentes a la Sigatoka Negra.....	13
Biología Molecular.....	14
La molécula de ADN.....	14
Reactivos empleados en los protocolos de extracción de ADN.....	14
Electroforesis en geles.....	18
Estudios moleculares de <i>Mycosphaella fijiensis</i>	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
Obtención de las cepas del hongo.....	22
Tratamientos.....	22
Extracción de ADN.....	23
Electroforesis en geles de agarosa al 1%.....	24
Cuantificación del ADN de las muestras.....	24

Pruebas de amplificación.....	24
Prueba de rendimiento en la producción de biomasa del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en los distintos tratamientos analizados.....	25
RESULTADOS.....	27
Obtención de las cepas del hongo.....	27
Tratamientos.....	27
Extracción de ADN.....	29
Electroforesis en geles de agarosa al 1% y cuantificación del ADN de las muestras.....	29
Pruebas de amplificación.....	39
Prueba de rendimiento en la producción de biomasa del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en los distintos tratamientos analizados.....	40
DISCUSIÓN.....	46
Extracción de ADN y Electroforesis en geles de agarosa al 1%.....	46
Pruebas de amplificación.....	47
Prueba de rendimiento en la producción de biomasa del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en los distintos tratamientos analizados.....	48
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXOS.....	58

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados obtenidos de la concentración de ADN (ng/μl) de las muestras evaluadas en el tratamiento A.....	30
Cuadro 2. Resultados obtenidos de la concentración de ADN (ng/μl) de las muestras evaluadas en el tratamiento B.....	33
Cuadro 3. Resultados obtenidos de la concentración de ADN (ng/μl) de las muestras evaluadas en el tratamiento C.....	36
Cuadro 4. Réplicas contaminadas durante el desarrollo de la prueba de rendimiento de los medios.....	40
Cuadro 5. Peso fresco y peso seco de la biomasa producida en las diferente réplicas de los tratamientos analizados.....	44
Cuadro 6. Análisis de los resultados obtenidos en la prueba de rendimiento de los medios utilizando la prueba t.....	45

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Colonias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> cultivadas en el tratamiento A.....	28
Fig 2. Colonias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> cultivadas en el tratamiento B.....	28
Fig 3. Colonias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> cultivadas en el tratamiento C.....	28
Fig 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras control con carbón activado tratamiento A.....	30
Fig 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras testigos sin carbón activado tratamiento A.....	31
Fig 6 . Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 300 µl de buffer de extracción tratamiento A.....	31
Fig 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 600 µl de buffer de extracción tratamiento A.....	31
Fig 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1200 µl de buffer de extracción tratamiento A.....	32
Fig 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1500 µl de buffer de extracción tratamiento A.....	32
Fig 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras testigos con carbón activado tratamiento B.....	34
Fig 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras control sin carbón activado tratamiento B.....	34
Fig 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 300 µl de buffer de extracción tratamiento B.....	34
Fig 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 600 µl de buffer de extracción tratamiento B.....	35
Fig 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1200 µl de buffer de extracción tratamiento B.....	35
Fig 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1500 µl de buffer de extracción tratamiento B.....	35
Fig 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras control con carbón activado tratamiento C.....	37

Fig 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras control sin carbón activado tratamiento C.....	37
Fig 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 300 µl de buffer de extracción tratamiento C.....	37
Fig 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 600 µl de buffer de extracción tratamiento C.....	38
Fig 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1200 µl de buffer de extracción tratamiento C.....	38
Fig 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1500 µl de buffer de extracción tratamiento C.....	38
Fig 22. Resultado de la prueba de amplificación de las muestras tomadas al azar del tratamiento C.....	39
Fig 23. Contaminación de las réplicas del tratamiento con medio sólido una semana después de su inoculación.....	40
Fig 24. Crecimiento de colonias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en los diversos tratamientos una semana después de la inoculación (medio líquido, medio sólido, medio con filtro).....	41
Fig 25. Fotografías al microscopio del desarrollo de las colonias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> en el tratamiento sólido.....	41
Fig 26. Fotografías al microscopio de las réplicas que presentaron contaminación en el tratamiento con medio sólido.....	42
Fig 27. Crecimiento de las colonias de <i>M. fijiensis</i> a las dos semanas del cultivo (medio líquido, medio sólido, medio con filtro).....	43

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Diferentes enfermedades que afectan el cultivo del banano.....	58
Anexo 2. Metodología recomendada para la extracción de ADN del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	59
Anexo 3. Preparación de los reactivos empleados durante la extracción.....	60

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El campo de la biología molecular tuvo su mayor impulso a partir de la elucidación de la estructura del ADN por Watson y Crick en los años 50; pero la actividad se aceleró con el desarrollo de la ingeniería genética y las técnicas del ADN recombinante (Smith y Wood, 1998).

El ADN es la sustancia central para el control celular ya que este regula y dirige la mayor parte de las actividades fundamentales de la célula. Debido a la gran importancia de esta molécula, es fundamental contar con métodos adecuados de aislamiento y purificación de la misma, que permitan en la aplicación de diversas técnicas de biología molecular la obtención de ADN de alto peso molecular de excelente calidad (Madriz, 2005).

La calidad de un material genético obtenido va a estar influenciada por el protocolo así como del tipo de tejido que se utilice. De ahí que sea de suma importancia la selección del método que mejor se ajuste a los objetivos del trabajo a realizar (Lodhi *et al.*, 1994, Madriz, 2005). Existen muchos protocolos ya establecidos, entre estos se encuentra el protocolo de Lodhi *et al.* (1994) que utiliza CTAB como detergente para solubilizar el ácido nucleico, el de Chen en 1999 y otras investigaciones que han reportado buenos resultados con el empleo del detergente CTAB.

La Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A) es una institución al servicio del productor bananero nacional es cual al darse cuenta que las técnicas tradicionales ya no resultan eficientes en el manejo y combate de plagas y enfermedades que afecten al cultivo del banano ha incursionado en las nuevas técnicas del campo de la biología molecular. El cual es un medio para estudiar mejor la ecología y biología de los patógenos para predecir su comportamiento (Jacome *et al.*, 2002).

Debido a la importancia que tiene un excelente aislamiento del material genético del organismo analizado es que en esta investigación se pretende desarrollar un protocolo que permita obtener ADN de excelente calidad del hongo *Mycosphaerella fijiensis* para ser utilizado en posteriores investigaciones.

INTRODUCCION

El banano es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, con ventas de más de 5 billones (US) por año. Los países latinoamericanos son grandes productores de banano, el primer lugar en producción lo ocupa Ecuador seguido por Costa Rica (AILA, 2004).

A pesar de que Costa Rica está muy consolidado en la producción de banano a nivel mundial, la empresa bananera ha venido en los últimos tiempos cayendo en una crisis, producto de las innumerables plagas y enfermedades que han surgido, que aumentan los costos de producción, así como las trabas arancelarias y no arancelarias de los países a los cuales se les exporta el producto (Vargas, 1999).

Una de las mayores plagas que afecta el cultivo del banano en Costa Rica corresponde a la enfermedad causado por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis*, llamada Sigatoka Negra.

La Sigatoka Negra, se describió como una enfermedad nueva en 1963, en Fiji, aunque existen evidencias de su presencia en Hawái y en algunas zonas del Pacífico desde mucho antes. En Centroamérica se describió por primera vez en Honduras en 1972 y desde allí se diseminó por el resto de la región. En Suramérica se registró por primera vez en Colombia en 1981, posteriormente en Ecuador en 1989 (Aguirre *et al.*, 2003). Según los registros, a nuestro país la enfermedad se reportó por primera vez en 1979 en la región de San Carlos, afectando a más de 2000 hectáreas de plátano y banano (González y Jaramillo, 1979; Rivas *et al.*, 2004). En la actualidad la enfermedad se distribuye a lo largo de todo el país.

Esta enfermedad causa una reducción significativa en el área foliar efectiva resultando en pérdidas de cosecha de un 50 % o más. También puede provocar la madurez de los frutos prematuros, lo que ocasiona un grave problema para la exportación (Nakyanzi, 2002).

El patógeno que causa la enfermedad produce conidios y ascósporas, de las cuales las dos son infecciosas. Dichas estructuras se forman bajo condiciones de alta humedad y se dispersan por la lluvia y el viento. En países que producen banano para la exportación

como los de América Latina, la Sigatoka Negra se trata de controlar por medio de frecuentes aplicaciones de funguicidas. Esta práctica resulta muy costosa debido a que se hace por medio de avionetas, helicópteros u otros medios (Nakyanzi, 2002). Además de las consecuencias ambientales que eventualmente podría acarrear una mala aplicación.

A lo largo del tiempo se han hecho esfuerzos para tratar de controlar la enfermedad, sin embargo la mala aplicación de los plaguicidas, la falta de información del productor, la evolución del patógeno, entre otras razones, han provocado que *M. fijiensis* haya logrado desarrollar resistencia a la mayoría de productos que se usan para su control.

El Centro de Investigaciones CORBANA La Rita, es una institución que está al servicio del productor bananero, por medio de las diversas investigaciones que se llevan a cabo en sus instalaciones brinda soluciones a los diferentes problemas que se presentan en el cultivo del banano para que en el país se produzcan ejemplares de excelente calidad y por ende se obtengan mejores oportunidades en el comercio exterior. La empresa siempre se ha enfocado a explorar nuevos horizontes que muestren ser prometedores para el futuro de la empresa.

Debido a que en estos momentos CORBANA trata de enfocar el control de las enfermedades que afectan al banano desde una perspectiva de prevención más que de combate, es que se está incursionando en el campo de las técnicas moleculares.

En los últimos años han surgido una gran variedad de técnicas para estudios genéticos y propagación masiva de plantas. Se han desarrollado marcadores moleculares, como AFLPs, isoenzimas, RFLPs, RAPDs, y recientemente los microsatélites, que permiten el mapeo genético, la caracterización de poblaciones y el mejoramiento genético, entre otros.

Las técnicas tradicionales cada vez se vuelven más obsoletas dentro de un sistema donde la ciencia avanza a pasos agigantados; para el productor agrícola la biología molecular propone nuevas soluciones para el manejo adecuado de los cultivares, un diagnóstico temprano de enfermedades y un mejoramiento genético de las plantas por lo que es de suma importancia que el país se este adentrando en este campo.

Debido a la gran importancia del desarrollo de bases sólidas en el éxito de un programa, es que en este trabajo se tratará de estandarizar y optimizar el método de extracción de ADN de *Mycosphaerella fijiensis*, como herramienta fundamental para futuras investigaciones que se desenvuelvan alrededor de este patógeno.

La investigación que se presenta a continuación se desarrolló en las instalaciones de la Corporación Bananera Nacional en La Rita de Pococí, Limón, dentro del nuevo enfoque que la institución está promoviendo para el combate contra plagas y enfermedades así como el mejoramiento genético del cultivo del banano, con el objetivo de ayudar al productor bananero para que sea más competente en el mercado nacional e internacional.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar y optimizar un protocolo de extracción de ADN del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la enfermedad Sigatoka Negra.

Objetivos Específicos

- Determinar la eficiencia del método CTAB para la extracción de ADN de *Mycosphaerella fijiensis*.
- Comparar el rendimiento de tres métodos de cultivo *in vitro* y la respuesta del material en rendimiento de ADN extraído
- Medir la eficiencia del protocolo con base en la cantidad de solución buffer utilizado en la extracción.
- Validar el uso del carbón activado en el proceso de extracción en la calidad del producto obtenido.
- Realizar un análisis para determinar cuáles reactivos se pueden reducir en la metodología de extracción de ADN, lo que permita disminuir costos en el proceso.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El cultivo del banano

Características generales del cultivo del banano

La domesticación inicial del cultivo del banano se originó en Indonesia y en el sureste de Asia. A partir de ahí se esparció a las regiones del trópico y subtropical del mundo donde tomó gran importancia y popularidad (Nakyanzi, 2002).

El banano comestible se ubica en la clase *Eumusa* y tiene su origen en dos especies silvestres llamadas *Musa acuminata* (genoma A) y *Musa balbisiana* (genoma B), los cuales son nativos del sureste de Asia. El cruce entre estas dos variedades *M. acuminata* (AA) y/o *M. balbisiana* (BB) ha dado origen a una serie de grupos entre los cuales se pueden encontrar AA, AB, AAA, AAB, ABB, AABB, AAAB y ABBB (Nakyanzi, 2002).

El banano comestible puede tener un genoma diploide, triploide o tetraploide con un número de cromosomas de 22, 33, 44, con un número básico de 11. Este tipo de banano ha evolucionado de un cultivar silvestre y con semillas, a un cultivo que produce frutos partenocárpicos, desprovistos de semillas, cuando la flor femenina no es polinizada (Nakyanzi, 2002).

Los cultivares triploides son los más numerosos, seguidos de los diploides y los grupos tetraploides son los que se encuentran con menor frecuencia (Nakyanzi, 2002).

A nivel mundial se producen más de 85 millones de toneladas anuales de banano, las plantaciones de banano son de gran importancia en los bosques húmedos y en regiones del trópico de mediana altura, donde se ha convertido en una de las fuentes alimentarias principales (Nakyanzi, 2002). Por ejemplo en Costa Rica el cultivo del banano corresponde a una de las actividades económicas de mayor importancia, queda trabajo de forma directa a unas 40 mil personas (Ferreira, 2001).

Sin embargo para Costa Rica, a pesar de ser el segundo productor de la fruta a nivel mundial, el mercado del banano es muy fluctuante provoca inestabilidad en el campo laboral. Uno de los mayores problemas que están sufriendo los productores de banano en este momento es la sobreoferta, situación para la cual no habrá solución y, por lo tanto, continuará agravándose pues se trata de la principal consecuencia y contradicción del actual modelo de producción (Ferreira, 2001).

El cultivo del banano es afectado por una serie de plagas y enfermedades, las cuales en muchas ocasiones provocan pérdidas millonarias en las plantaciones. Algunas de las plagas más comunes son: el marchitamiento bacteriano causado por *Ralstonia solanacearum*, la mancha Cordada producida por *Cordana musae*, la pudrición de las raíces enfermedad causada por *Erwinia*, la enfermedad del virus “Banana streak virus”, la Sigatoka Negra y Amarilla, entre otros (Vea Anexo 1) (Pineda., *et al*; 1997; Nakyanzi, 2002)

Uno de los ataques más importantes, corresponde a la enfermedad de la Sigatoka Negra la cual es mucho más agresiva que la Sigatoka Amarilla, producida por el hongo *Mycosphaerella musicola*. La Sigatoka Negra es causada por el hongo ascomicete *Mycosphaerella fijiensis*, es una enfermedad desastrosa en los cultivares de banano, es por esto que las nuevas investigaciones se enfocan en la obtención de nuevos híbridos resistentes a ella así como el desarrollo de técnicas moleculares para tratar de controlar esta enfermedad (Johanson., *et al*, 1994; Osava, 2003).

Colecciones de recursos fitogenéticos de banano

La Corporación Bananera Nacional (CORBANA), cuenta con dos estaciones experimentales, La Rita ubicada en el cantón de Pococí, Limón y la estación 28 millas localizada en la cantón de Matina, Limón; La Rita cuenta con colecciones de variedades de *Musa sp* (Conaferi, 1995). Otros centros con colecciones de germoplasma de *Musa sp* en Costa Rica son el CATIE, ubicado en Turrialba y la EARTH, localizada en Guácimo, Limón.

Una de las colecciones de mayor importancia, a nivel mundial, es el Centro de Tránsito de INIBAP, ubicado en Montpellier Francia, el cual ayuda a diversos países en la conservación de germoplasma de las Musáceas (INIBAP, 2002).

El mejoramiento genético de *Musa sp*

Debido a que la enfermedad de Sigatoka Negra provoca pérdidas millonarias en las plantaciones de Musáceas, diversos centros de investigación se han dedicado a la búsqueda y al desarrollo de nuevas variedades de *Musa sp* resistentes a la enfermedad. La variedad de banano más susceptible a *M. fijiensis* corresponde al grupo Cavendish, el cual es el más exportado en el mundo (Nakyanzi, 2002; Osava, 2003).

Uno de los países que en la actualidad cuenta con variedades resistentes a la Sigatoka Negra es Brasil, estas variedades pertenecen al grupo Plata, el más producido en el país al igual el Pacovan Ken (resistente a las dos formas de Sigatoka y a la enfermedad de Panamá), dichas variedades han sido desarrolladas por la EMBRAPA (Empresa Brasileña de Pesquisa Agropecuaria). Otra de las instituciones que han experimentado en este campo es el Instituto Agronómico de Campinas, ubicado cerca de Sao Paulo, él cual desarrolló la variedad IAC 2001, que era resistente a la Sigatoka Negra, pero los ejemplares perdieron esta característica dos años después de ser sembrados en la Amazonia (Osava, 2003).

La metodología para obtener mejores variedades de banano lleva tiempo, porque el ciclo vital de la planta dura más de un año, y eso hace lento el proceso de evaluaciones, cruces y comprobación. Son casi 12 años hasta el resultado final. El método tradicional mediante el cruce biológico convencional es muy limitado en el caso del banano, porque muchas variedades, en especial las más cultivadas, tienen frutos estériles, es por eso que las técnicas biotecnológicas serían de gran ayuda en este campo (Osava, 2003).

Lo que en la actualidad se está haciendo es tratar de ubicar genes resistentes que puedan ser transferidos a otras variedades. La estrategia es comparar el genoma del banano con el del arroz, la gramínea más estudiada, y concentrar la investigación en genes cuya

información se expresa en las hojas, donde ataca la Sigatoka Negra. También se busca identificar genes de otras especies que puedan otorgar resistencia al banano (Osava, 2003).

La enfermedad de Sigatoka Negra

Origen de la enfermedad

La enfermedad de Sigatoka Negra, fue descrita por primera vez en Fiji en el año de 1963, aunque hay evidencias de su presencia en Hawai y en algunas zonas del Pacífico desde mucho antes. El primer estudio detallado de la misma fue hecho en 1969 por Meredith y Lawrence. Fue en el año de 1972, en Honduras, donde apareció por primera vez fuera de Asia, así como en Zambia en 1973. Posteriormente la enfermedad se fue diseminando a diversos países como México y los países centroamericanos, donde el surgimiento se dio entre 1977 y 1980, en Colombia en 1981 posteriormente en Ecuador en 1989 y más recientemente en Cuba y Venezuela (Pineda., *et al*, 1997; Aguirre., *et al*, 2003).

Existen dos variedades de *Mycosphaerella fijiensis*, *M. fijiensis* var. *fijiensis* y *M. fijiensis* var. *difformis*. Entre ambas no existen diferencias morfológicas en el estado teleomorfo. La var. *difformis* se caracteriza por la presencia de un estroma que da origen a pocos o densos fascículos de conidióforos, en contraste con la ausencia del estroma para el estado anamorfo de la var. *fijiensis*. Para diagnosticar si una planta esta contaminada con estos patógenos se realizan observaciones microscópicas, sin embargo los síntomas y las diferencias morfológicas hacen que la identificación de ambas variedades sea confusa, por lo que en 1987 Pons sinonimia a estos dos hongos conservando el nombre de *M. fijiensis* (González y Jaramillo, 1979; Pineda., *et al*, 1997).

En Costa Rica, la enfermedad se describió en 1979 en la región de San Carlos, afectando a más de 2000 hectáreas de plátano y banano (González y Jaramillo, 1979). En la actualidad la enfermedad se distribuye a lo largo de todo el país.

Síntomas de la enfermedad

El único órgano afectado por *M. fijiensis* es la hoja, destruyendo el follaje rápidamente si no se aplican medidas de control, asimismo, como resultado del ataque se observan síntomas característicos en los frutos (Senasa, 2003).

Los primeros síntomas son visibles a simple vista en el envés de la hoja como puntos café rojizos. Los puntos se alargan y forman estrías café rojizas (Gavilán, 1995). La distribución de las estrías puede ser muy variable: hacia el ápice, en ambos lados de la lámina, y a lo largo de toda la vena central de la hoja (González y Jaramillo, 1979). La estría se alarga ligeramente y hay un cambio de color de café rojizo a café oscuro o casi negro, esto constituye el segundo estado de las estrías. Las estrías se agrandan, se hacen más anchas y adquieren forma elíptica, rodeándose de un borde café claro alrededor de la mancha. Este es el primer estado de manchas (Gavilán, 1995).

El segundo estado ocurre cuando el centro negro de la lesión se hunde ligeramente y el borde se hace más pronunciado. Algunas veces puede presentar un ligero amarillamiento del tejido alrededor de la lesión, no tan frecuente como la Sigatoka Amarilla (Gavilán, 1995).

En el tercer estado de la mancha, el centro de la lesión se seca, se vuelve ligeramente gris y aumenta la depresión. La lesión es rodeada por un angosto borde negro bien definido. Al presentarse una gran densidad de lesiones, estas se unen y la hoja entera se torna negra y muere entre 3 a 4 semanas después de los primeros síntomas. El color de los puntos, las estrías, las manchas, la alta densidad de las mismas y la distribución a lo largo de la hoja y a ambos lados de la vena central, son características que la hacen claramente distinguible de la Sigatoka Amarilla (González y Jaramillo, 1979).

Como resultado de la destrucción del follaje, la producción de fruta se reduce drásticamente, sin embargo, también ocasiona un llenado deficiente y la maduración prematura de los dedos en el campo, durante el transporte o el almacenaje, daño se considera como el más importante. Este daño, estaría determinado por la acción de toxinas del patógeno, más que debido a la defoliación (Senasa, 2003).

La producción de conidióforos ocurre en dos estructuras fructíferas diferentes: solos que van de 1 a 2, sencillos que van de 2 a 3 o en grupos de 3 a 4, sin formar esporoquio o en grupos de 4 a 20, en el tejido espermogonial inmaduro. Tanto el conidióforo como las conidias presentan una conspicua cicatriz. La Sigatoka Negra es muy virulenta, ya que presenta una producción de ascósporas por unidad de superficie muy elevada, lo que provoca que se de una mayor proliferación de peritecios. La mayor esporulación se da en el envés de la hoja (González y Jaramillo, 1979).

Aspectos epidemiológicos de la enfermedad

Los factores epidemiológicos, así como los evolutivos son de suma importancia ya que a través de ellos se logra comprender los procesos de dispersión y el impacto que tiene el flujo de genes. Una rápida dispersión aérea de los patógenos a una escala global o continental pueden acarrear graves consecuencias en cuanto a la fitopatología. Según Carlier, (2004) existen dos formas de dispersión a partir de la fuente del inóculo. La primera consiste en una rara e impredecible solo-paso de invasión, que envuelve el transporte de esporas a través de largas distancias e incluso continentes. Esta forma estocástica de dispersión puede resultar del transporte de material vegetal contaminado y tiende a ocurrir por o general de forma global. La segunda forma consiste en la expansión gradual, dentro de un continente, por medio de procesos de dispersión normales (Carlier, 2004).

En el caso de *M. fijiensis*, el patógeno representa un ejemplo de una epidemia fúngica reciente, la cual se ha dispersado al mundo tropical. (Carlier, 2004).

M. fijiensis es un hongo haploide, ascomicete que se puede dispersar de tres modos diferentes: el primero corresponde al movimiento de material vegetal infectado (chupadores infectados y hojas contaminadas que se utilizan para envolver comidas u otros bienes); el segundo a la dispersión de ascósporas (producidas durante la reproducción sexual) y por último, la dispersión de conidios (producidos durante la reproducción asexual). Mientras que los conidios, por lo general, se dispersan a través de cortas

distancias, las ascósporas viables se pueden transportarse cientos de kilómetros por medio del viento (Carlier, 2004).

A nivel local, la principal fuente de contaminación lo constituyen las hojas enfermas que no son removidas de la planta, en donde se producen las esporas sexuales y asexuales las cuales se dispersan a otras plantaciones de plátano o de banano. Las hojas infectadas, adheridas a las plantas constituyen la fuente permanente de estructuras infectivas del hongo. Se ha determinado que en hojas adheridas a las plantas, el patógeno produce sus esporas por periodos de varios meses, en cambio en hojas cortadas y colocadas en el suelo, este periodo se reduce (Senasa, 2003).

Dispersión de *M. fijiensis*

En la dispersión de *M. fijiensis* tanto los conidios como las ascósporas juegan un papel de suma importancia. Los conidios, que no se liberan por acción del viento se dispersan especialmente a través del lavado y la salpicadura de las gotas de lluvia, por lo cual se dice que están asociadas con la dispersión local de la enfermedad. Mientras tanto, las ascósporas son fácilmente arrastradas por el viento por lo cual son responsables de la dispersión de la enfermedad a grandes distancias, sin embargo, su transporte se ve limitado por su susceptibilidad a la radiación ultravioleta (Senasa, 2003).

El ser humano ha diseminado la Sigatoka Negra al transportar hojas infectadas, desde las áreas infestadas a las áreas libres. Ésta probablemente ha sido la forma en la cual el agente causal ha llegado a zonas aisladas geográficamente, superando barreras geográficas naturales que hubieran impedido la diseminación natural del patógeno (Senasa, 2003).

Condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad

Las condiciones que favorecen el desarrollo del patógeno de la Sigatoka Negra son: alta precipitación, temperatura y humedad relativa. La temperatura favorable está por encima de los 21°C y hasta los 28°C. Las estaciones secas, las noches sin rocío, los suelos bien

drenados y una plantación aireada son condiciones devastadoras para la propagación y desarrollo del hongo (González y Jaramillo, 1979).

Control de la enfermedad

Para el control de la Sigatoka Negra, se debe implementar un programa de aspersión aérea de funguicidas combinado con prácticas culturales. Se deben eliminar las hojas enfermas o partes dañadas para evitar la descarga de ascósporas. Es necesario un buen control de las malezas, así como un sistema de drenaje adecuado, un control de la densidad de las plantas cultivadas y la siembra de clones resistentes, entre otros (Senasa, 2003; González y Jaramillo, 1979).

Los funguicidas utilizados son: benzimidazoles (Benlate, Topsin, Cycosin) y bisditiocarbamatos (Dithane M-45, Manzate 200); estos productos se han usado por separado o mezclados, alternándolos entre un ciclo y otro. Se aplican cada 15 días o en épocas de emergencia cada 8 o 10 días (González y Jaramillo, 1979).

Siembra de variedades resistentes a la Sigatoka Negra

La siembra de variedades resistentes provee el medio ideal para el control de plagas. En el caso del plátano se han obtenido clones con niveles apreciables de resistencia, por ejemplo en la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) se han obtenido clones tetraploides tipo banano (FHIA01, FHIA 02, FHIA 18, FHIA 23), plátano (FHIA 21) y bananos de cocción (FHIA 03, FHIA 25) con estas características. Algunos de estos genotipos han mostrado su resistencia, pero no han tenido la aceptación esperada debido a sus características organolépticas, maduración prematura en campo o corta vida de anaquel, características que los ponen en desventaja, por no ser atractivos para el mercado. Sin embargo estos clones se pueden utilizar potencialmente con fines de transformación (Senasa, 2003).

Sin embargo, algunos clones que se cultivan tradicionalmente muestran niveles importantes de resistencia, siendo uno de los más importantes el “Isla”, aunque aún no ha sido caracterizado genéticamente (Senasa, 2003).

Biología Molecular

La molécula del Ácido Desoxiribonucleico (ADN)

Los organismos están formados por una variedad de moléculas, dentro de ellas, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Estas moléculas, que contienen la información genética de los organismos, tienen una estructura básica que contiene un azúcar, un grupo fosfato y una secuencia de bases nitrogenadas que se unen por puentes de hidrógeno, para formar estructuras de doble cadena (Smith y Wood, 1998).

El ADN es la sustancia central para el control celular ya que este regula y dirige la mayor parte de las actividades fundamentales de la célula. Debido a la gran importancia de esta molécula, es fundamental contar con métodos adecuados de aislamiento y purificación de la misma, que permitan en la aplicación de diversas técnicas de biología molecular la obtención de ADN de alto peso molecular de excelente calidad (Madriz, 2005).

La calidad de un material genético obtenido va a estar influenciada por el protocolo así como del tipo de tejido que se utilice. De ahí que sea de suma importancia la selección del método que mejor se ajuste a los objetivos del trabajo a realizar (Madriz, 2005, Lodhi *et al.*, 1994).

Reactivos empleados en los protocolos de extracción de ADN

Para lograr extraer ADN de algún organismo, tejido u órgano se debe emplear un procedimiento adecuado que a través de diversas etapas culmine con la extracción de material genético.

En la primera etapa del procedimiento se da una fase de rompimiento de tejidos y lisis celular, la cual tiene el objetivo primario de solubilizar el ADN; para lograr este cometido es que se emplea el buffer de extracción. Cada uno de los compuestos que conforman el buffer de extracción cumplen una función específica. A continuación se detallan los compuestos que en este protocolo se van a emplear.

El compuesto Tris-HCl pH 8, tiene la función de alcalinizar el medio en que se encuentra el ADN y así darle una mayor estabilidad a esta molécula, lo que permite obtener ADN de buena calidad, ya que en las extracciones con fenol el pH de la solución amortiguadora es relevante. El Tris-HCl emulcifica las grasas y permite separar el ADN de las proteínas por medio de su degradación (Rogers y Bendich, 1998, Madriz y Peraza, 2005), la alcalinidad de este compuesto permite aumentar la solubilidad de los ácidos desoxiribonucleicos en agua, esto debido a que las purinas y las pirimidinas a pH neutro son relativamente insolubles en agua, pero al aumentarles o bajarles el pH del medio en que se encuentran se vuelven hidrofílicas ya que adquieren carga.

El EDTA, cumple la función de quelar iones de magnesio (cofactor de muchas nucleasas), inhibiendo así su actividad en conjunto con el pH alcalino (Rogers y Bendich, 1998 y Valadez y Kahl, 2000.); NaCl, que brinda estabilidad al ADN y evita la degradación de la molécula. Se utiliza como detergente CTAB (Hexadecyltrimetil-ammonium Bromide) que elimina grasas y destruye membranas celulares. Este compuesto permite la separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos por diferencia de solubilidades en la presencia de dicho detergente. Dicho compuesto se une fuertemente al ADN, removiendo las proteínas y previniendo la degradación del ADN (Lodhi *et al.*, 1994 y Mygind *et al.*, 2003).

Por otro lado, el uso del PVP se el buffer de extracción se hace con el objetivo de remover polifenoles mediante la formación de puentes de hidrógeno con estas moléculas, las cuales pueden separarse del ADN por simple centrifugación, aumentando así la pureza del material final (Kim *et al.*, 1997)

Para la extracción de material genético también se utiliza mercaptoetanol que es un agente oxidante que desnaturaliza proteínas ya que rompe los puentes disulfuro que las conforman (Rogers y Bendich, 1998).

Uno de los compuestos que se introdujo en la presente investigación fue el carbón activado; compuesto que se une a los compuestos resinosos y coloreados aumentando la pureza del ADN que se extrae. La investigación hecho por Vroh *et al.*, en 1996 demuestra que el uso de carbón activado durante el proceso de extracción de ADN aumenta los resultados que se obtienen durante pruebas de amplificación con RAPD.

Por lo general los mayores contaminantes en los procesos de extracción de ADN son los polisacáridos, los compuestos polifenólicos y otros compuestos secundarios (Lodhi *et al.*, 1994). Estos compuestos deben de ser removidos del ADN ya que pueden interaccionar de forma irreversible con las proteínas y los ácidos nucleicos (Vroh *et al.*, 1996).

El carbón activado tiene la capacidad de absorber materia resinosa e impurezas coloreadas en fase acuoso a altas temperaturas (Vroh *et al.*), de ahí que las muestras que se evaluaron se pusieron en baño Maria a 65 °C por 1 hora. Además las altas temperaturas ayudan a que la lisis de las membranas celulares ocurra con mayor rapidez y eficacia.

Uno de los mayores problemas que se puede presentar en los protocolos de extracción de ADN de hongos u organismos que tejidos duros es el obstáculo de obtener ADN de alto peso molecular ya que puede haber contaminación con componentes de las paredes celulares y otros compuestos. Para lograr degradar las paredes se utiliza un compuesto conocido como glucanex; el cual es distribuido por Novo Nordisk. Glucanex es un preparado enzimático, el cual se obtiene por fermentación sumergida, de hongos del género *Trichoderma* y es utilizado para eliminar β 1-3-1,6 glucanos fúngicos contaminantes. Sin embargo el utilizarlo en los protocolos aumenta los costos así como el tiempo de trabajo (Birch, 1998)

Para separar los compuestos orgánicos de los ácidos nucleicos se adiciona cloroformo-isoamil alcohol (24:1) agentes que llevan a cabo una desproteinización más efectiva. El

cloroformo tiene la propiedad que desnaturaliza proteínas y remueve lípidos (Madriz y Peraza, 2005).

Al agregar el cloroformo-isoamil alcohol a la muestra (24:1) se logra la combinación de la acción de ambos compuestos, ya que por separado cada uno se utiliza para separar proteínas y polisacáridos de los ácidos nucleicos, pero la utilización de ambos juntos permite la agregación de los complejos proteína-polisacárido. El cloroformo es más denso que el agua, por lo que luego de una centrifugación se forman dos fases, la inferior en donde se encuentra el cloroformo- isoamil alcohol con las proteínas y polisacáridos, y en la superior en la cual se mantiene el ADN. Este paso es muy importante ya que si los polisacáridos no son removidos correctamente muchos procesos enzimáticos no podrían llevarse a cabo correctamente (Lodhi *et al.*, 1994).

Para lograr una separación bien efectiva de las fases la muestra se centrifuga y se recupera la fase acuosa a la cual se le adiciona isopropanol a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ el cual deshidrata el ADN haciendo que precipite (Mygind *et al.*, 2003); para luego volver a centrifugar y obtener un botón en el cual estaban los ácidos nucleicos del tejido.

Para purificar el botón de ADN obtenido se pueden emplear buffer de lavado que arrastren sales u otros componentes que pudieran haber precipitado con el material genético. También se puede emplear alcohol frío al 70% para remover las impurezas, como restos de compuestos fenólicos y sales.

Por último el ADN se debe resuspender, por lo general en TE, compuesto que mantiene el ADN estable y no permite que se degrade, además mediante el uso del EDTA se evita la actividad de nucleasas que todavía estén presentes en el material final y que puedan degradar el ADN. (Mygind *et al.*, 2003).

Electroforesis en geles

Una vez obtenido el ADN, un método para el estudio de la calidad de este es la electroforesis en gel, el cual es un procedimiento por el que las moléculas cargadas migran diferencialmente cuando se les somete a un campo eléctrico (Mathews y van Holde, 1998).

La electroforesis es una técnica que permite separar moléculas de ADN y ARN de acuerdo a su tamaño en una matriz determinada. Se utiliza como método analítico para la purificación de fragmentos de ADN específicos. El gel empleado puede ser de poliacrilamida o agarosa dependiendo del tamaño del segmento de material que se desea preparar. La agarosa es conveniente para separar fragmentos de ADN en un rango de tamaño de 20 kb a unos cientos de las mismas, mientras que la poliacrilamida es preferible para fragmentos de ADN pequeños (Alberts *et al.*, 2002).

El gel de electroforesis es un complejo medio de moléculas poliméricas que permite que las moléculas de ADN cargadas negativamente bajo un impulso eléctrico migren alrededor del gel dependiendo de sus tamaños, de modo que las moléculas pequeñas pueden pasar fácilmente a través del gel y por lo tanto migrar más rápido que las moléculas más grandes basándose en el hecho de que el desplazamiento de las moléculas mostrado es inversamente proporcional a los logaritmos de sus pesos moleculares (Alberts *et al.*, 2002).

En cualquier evento, la electroforesis en gel es efectuada con marcadores de ADN de tamaño conocido que permite la determinación del tamaño de la molécula de ADN desconocida por interpolación (Alberts *et al.*, 2002).

Para lograr visualizar el ADN que se logra extraer se utiliza bromuro de etidio colorante fluorescente que tiene la capacidad de unirse al ADN doble banda mediante intercalación (Mathews y Van Holde, 1998). Este fenómeno se produce debido a que la molécula es plana y tiene aproximadamente el tamaño de un par de bases, confiriéndole la propiedad de acoplarse entre dos pares de bases y separarlas. La intercalación aumenta notablemente la fluorescencia de la molécula, haciendo posible observar el ADN exponiendo el gel a luz ultravioleta.

Es importante mencionar que durante el proceso de electroforesis y como producto de la hidrólisis de las moléculas de agua presentes en la reacción, se da la liberación de moléculas de oxígeno y de hidrógeno, las cuales proporcionan los electrones necesarios para que ocurra el paso de corriente a través del gel. Dicho fenómeno se ve favorecido por la presencia de iones aportados por la solución amortiguadora de electroforesis, los cuales propician un mejor flujo electrónico y una mayor eficacia del proceso de separación (Mathews y Van Holde, 1998).

A través de las bandas que se obtienen se puede determinar la pureza y la concentración del ADN de las muestras. Según Valadez y Kahl (2000) la determinación de la calidad del ADN se suele hacer con base en el grado de degradación, ya que un ADN de alto peso molecular aparece como una banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos, mientras que el material parcialmente degradado forma un barrido de fragmentos pequeños a lo largo del pozo.

Estudios moleculares de *Mycosphaerella fijiensis*

Se han realizado pocas investigación entorno al patógeno de *Mycosphaerella fijiensis* es en el campo de la biología molecular. Carlier *et al* (1994) se examinaron polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) de patógenos del banano que causan daños foliares, *Mycosphaerella* spp., con copias de ADN nuclear aisladas de una librería de cósmidos de *M. fijiensis*. Al realizar los estudios los dos hongo relacionados, *M. musicola* y *M. fijiensis* mostraron diferentes patrones de RFLP e intensidades de hibridación, lo cual sugería una divergencia genética interespecífica considerable. El sinónimo de *M. fijiensis* var. *difformis* con *M. fijiensis* fue apoyado ya que los patrones de RFLP fueron muy similares y no reflejaron variaciones morfológicas entre los hongos. En esta indagación se trabajaron 57 aislamientos de *M. fijiensis* de diferentes sitios geográficos. El nivel de mayor diversidad genética se encontró en el Sureste de Asia, región de origen de la enfermedad de acuerdo con los datos cronológicos. En otras áreas, los aislamientos formaron grupos genéticamente homogéneos para cada región (África, Islas del Pacífico y América Latina). Esas diferencias geográficas sugieren que hubo una introducción limitada de *M. fijiensis* dentro de estas regiones.

Dichos investigadores también estudiaron la utilización de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) para diferenciar entre ADN de diferentes aislamientos del género *Mycosphaerella*. ADN de dos patógenos la enfermedad de Sigatoka, *M. fijiensis* y *M. musicola*, y otras especies de *Mycosphaerella* que comúnmente se encuentran en el banano, *M. musae* y *M. minima*, mostraron diferentes patrones de bandas en todas las pruebas de PCR utilizando diferentes primers. Uno de los primers que mayor información presentó fue el RC07 el cual amplificó en 11 aislamientos de *M. fijiensis* y estuvo ausente en otras especies de *Mycosphaerella*. Otro primer que mostró hidridación específica fue el PM06, el cual sólo amplificaba para *M. musicola*. Los resultados obtenidos en esta investigación se pueden emplear para diferenciar entre aislamientos de *Mycosphaerella* que causan la enfermedad de Sigatoka en el Sureste de Asia (Carlier *et al*, 1994).

Carlier en Montpellier Francia, estudió que existen tres formas para la dispersión del hongo, el primero corresponde al movimiento de material vegetal contaminado, el segundo a la dispersión de las ascóporas (producidas durante la reproducción sexual) y el tercer modo mediante la dispersión de conidios (producidos durante la reproducción asexual). La estructura de la población de *M. fijiensis* se analizó a escala global y de plantación mediante el uso de marcadores moleculares, los resultados indican que los niveles de diferencias genéticas se mantienen a estas escalas. Los análisis también sugieren que aún a nivel de plantas *M. fijiensis* se aparean de forma aleatoria. Efectos del fundador se detectaron a nivel global y continental. Las estructuras de las poblaciones observadas a nivel global y continental reflejan la historia de la dispersión de *M. fijiensis*.

Nakyanzi (2002), determinó la diversidad de la población de *M. fijiensis* de África del Este y su relación con aislamientos de otras regiones geográficas fueron analizados por diversas técnicas moleculares, como amplificaciones en PCR y digestiones de restricción (PCR-RFLP) de la subunidad de gen 25S rARN, primers de ARNt, microsatélites, RAPD-PCR y AFLP. La variación patogénica de algunas aislamientos también se analizó utilizando un ensayo con discos de hojas que provenían de cultivos *in vitro*. Las técnicas de PCR-RFLP, primers de ARNt y los microsatélites mostraron pocos polimorfismos entre los aislamientos de *M. fijiensis*, pero las tres técnicas si diferenciaban entre los aislamientos de

la región de Tanzania y el resto de África y otras regiones geográficas. Utilizando los resultados que reprodujeron las diferentes técnicas moleculares se construyeron dendrogramas que permitieron visualizar el comportamiento de la diversidad genética de los estos aislamientos.

Rivas *et al* (2004), infirieron el flujo genético y el proceso de dispersión de *M. fijiensis* a escala continental de análisis de la estructura de las poblaciones de regiones recién invadidas. Se emplearon muestras de aislamientos colectados de plantaciones de banano de 13 países de América Latina, el Caribe y África. Los aislamientos se analizaron con marcadores moleculares como los microsatélites y los PCR-RFLP. Los resultados indican que los niveles más altos de diversidad genética se mantienen a niveles de plantaciones y escala de plantas. A lo largo de la investigación los resultados muestran que los efectos del fundador acompañan la reciente invasión de *M. fijiensis* en las regiones de América Latina y el Caribe, esto sugiere un esparcimiento estocástico del mal a nivel continental, cuyo origen se pudo producir por la limitada dispersión de las ascósporas y el movimiento de material vegetal infectado.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de CORBANA S.A., ubicados en la Rita de Pococí en Limón. El proyecto tuvo diferentes etapas, la primera el cultivo de los hongos en los diversos tratamientos (líquido, sólido y filtro); la segunda la extracción y cuantificación del ADN obtenido; la tercera una prueba preliminar de amplificación de ADN utilizando los mejores aislamientos y por último una prueba de rendimiento de los medios evaluados.

Obtención de las cepas del hongo

Se trabajó con tres cepas aisladas y purificadas en el laboratorio de Fitopatología de CORBANA. Las cepas se obtuvieron de colectas hechas en parcela Yangambi km 5, ubicada en La Rita de Pococí, finca Uvita localizada en Limón y finca La Flor, ubicada en Parrita, Puntarenas; los aislamientos provenían de cultivos monoascospóricos.

La primera etapa que se desarrolló fue la recuperación de los hongos. Para ello, con la ayuda de una aguja de disección se tomaron pequeñas porciones de las colonias adultas y se cultivaron en agar Mycophil, por un período de dos semanas en plato petri grande, hasta alcanzar un tamaño aproximado de 1 cm², se transferían a un plato petri pequeño, durante 1 semana, para después sembrarlas según el tratamiento que correspondía.

Tratamientos de cultivo

El tratamiento de cultivo A correspondió al medio sólido Mycophil-agar, el tratamiento B al medio Mycophil-agar con una membrana porosa, papel filtro Whatman 40 y el tratamiento C al medio líquido mineral YEGK (Rivas *et al*, 2004), el cual está compuesto por 2 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 3 g de KNO₃ y 2 g de KH₂PO₄ por litro con un pH de 6. Para cada tratamiento se hicieron 5 réplicas.

Para el tratamiento A y B se tomaron las colonias que se habían recuperado y se subcultivaban en nuevos platos petri pequeños; mientras que para el tratamiento C, con la

ayuda de una aguja de disección se tomó una pequeña porción de la colonia y se inoculó en celdas estériles.

Las muestras se incubaron en oscuridad por un periodo de 15 días, al cabo del cual se procedió a la extracción del ADN. Los tratamientos A y B permanecieron a 26 °C, mientras que el tratamiento C se mantuvo a 24 °C.

Extracción de ADN del hongo

Para la extracción del material genético del hongo se utilizó como base el protocolo, para minipreparaciones, propuesto por Murray y Thompson (1980).

Se tomaban, aproximadamente, 0.03 g de micelio de hongo y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, adicionando 100 µL de buffer de extracción 2X CTAB y se procedió a macerar fuertemente con un pistilo.

Seguidamente se completó la totalidad del buffer de extracción, de acuerdo con las cantidades que se iban a analizar, en este caso se probaron 6 cantidades 300, 600, 1200, 1500 µL, más dos muestras control, de 900 µL.

De cada una de las réplicas de los tratamientos, se extrajeron 6 porciones de hongo para probar las diferentes cantidades de buffer. A excepción de una de las control, a cada muestra se le adicionó una punta de espátula (2.5 mg aproximadamente) y se agitó fuertemente en vortex. En la cámara extractora de gases se añadió 2 µL de mercaptoetanol y se agitó hasta homogenizar en vortex. Posteriormente se incubaron las muestras en un Baño María a 65 ° C por 60 minutos, transcurrido este período las muestras se dejan enfriar por 4 minutos, luego se adicionaron 400 µL de una solución 24:1 de cloroformo-isoamil alcohol a temperatura ambiente y se mezcló fuertemente con vortex. La muestra se centrifugó a 10500 g por 5 minutos, luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se repitió el paso anterior.

Con la ayuda de una micropipeta de 1 ml se transfirió el sobrenadante a un otro tubo eppendorf y se adicionó isopropanol (-20 °C) para precipitar el ADN. Las muestras se

dejaron reposar en el congelador durante toda una noche. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 10500 g por 5 minutos y se eliminó el isopropanol. Se adicionaron 150 μ l de alcohol al 70% frío, se agitó levemente y se centrifugó a 10500 g por 10 minutos, invirtiendo el tubo se eliminó el alcohol. Este paso se repitió, para luego dejar secar la muestra a temperatura ambiente. El ADN obtenido se resuspendió en 100 μ L de TE.

Electroforesis en geles de agarosa al 1%

Para la electroforesis de las muestras se tomaron 30 μ l del ADN extraído y se disolvieron en 30 μ l de TE para obtener una dilución de ½.

Para la preparación de los geles se pesó 1 g de agarosa por cada 100 ml de buffer TBE 1X y se adicionaron 10 μ l bromuro de etidio (10 mM), reactivo que se intercala entre el ADN y que fluoresce a 302 nm en una lámpara ultra violeta.

Para cargar los pozos del gel, se tomaron 5 μ l de la solución de ADN, 5 μ l de “loading buffer” Bpb y 17 μ l de TE. Además junto con las muestras se colocó un marcador de peso molecular, con el propósito de hacer una cuantificación visual de las muestras de la concentración de ADN en las muestras. Los geles se pusieron a migrar a 100 voltios constantes por una periodo de 1:45 h.

Cuantificación del ADN de las muestras

Para realizar la cuantificación de la cantidad de ADN se utilizó un marcador MassRuler™ DNA Ladder High Range por medio del cual se realizó una estimación visual de la concentración de ADN con las bandas que se obtenían luego de realizar la electroforesis.

Prueba preliminar de amplificación del ADN

Para las pruebas de amplificación se escogieron las cantidades 300 μ l, 600 μ l y los controles (900 μ l) sin carbón activado y con carbón activado del medio líquido. Para cada una de las cantidades de buffer de extracción se tomaron 5 muestras al azar y se llevaron a una dilución de 2 ng/ μ l.

Se preparó una mezcla, por medio de un protocolo confidencial que se está investigando en CORBANA utilizando un imprimador universal USB M4. Las muestras se pusieron en un termociclador Applied Biosystem PCR System 9700 y se programó para que se repitiera el ciclo 40 veces.

Una vez que se obtuvo el producto del PCR se tomaron 5 µl y se mezclaron con 5 µl de bromofenol y 17 µl de TE y se pusieron a migrar en un gel de agarosa al 1.2% con una concentración de bromuro de etidio y seguidamente el resultado se observó a 302 nm en una lámpara ultravioleta.

Prueba de rendimiento en la producción de biomasa del hongo Mycosphaerella fijiensis en los distintos tratamientos analizados

Para la prueba de rendimiento de los tratamientos se utilizó la cepa procedente de la parcela Yangambi km 5. Tanto para el medio líquido YEGK como del medio sólido Mycophil-agar y del medio Mycophil-agar con una membrana porosa (papel filtro Whatman 40) se evaluaron 10 réplicas.

En la cámara de flujo laminar se tomaron tres colonias y se colocaron en 20 ml de Tween 20 al 0.05% y se agitaron fuertemente en vortex hasta obtener una buena disgregación de las colonias. La solución se pasó por una criba de 60 mesh Para lograr homogenizarla, ésta, al producto obtenido se le hizo un conteo de las partes de micelio que contenía, por medio de un hemacitómetro. se realizaron 4 lecturas a las cuales se les sacó el promedio y se multiplicó por 2000. La concentración final de la solución era de 21000 partes de micelio por ml.

Posteriormente se tomó una alícuota de 0.5 ml y se inoculó en los diferentes medios de cultivo, esparciendo la solución con una espátula. Las muestras se incubaron a 26 °C en la oscuridad por un periodo de 15 días, tiempo al que se tomó el peso fresco. También se cuantificó el peso seco, por lo que los ejemplares se colocaron en una estufa a 40 °C hasta peso constante.

A los resultados obtenidos se les aplicó una prueba t, con un nivel de confianza del 95%. La prueba compara las medias de los datos analizados y produce probabilidades que van a indicar si existe diferencia significativa entre los mismos.

Después de una semana de la inoculación de los tratamientos, se realizó un estudio del crecimiento y la contaminación de los cultivos. A los quince días se evaluó la contaminación y el crecimiento de cada una de las réplicas de los tratamientos.

A la semana del cultivo, debido a que el crecimiento del medio sólido era tan pobre con respecto a los demás, se realizó una visualización de los cultivos al microscopio para determinar si había tejido desarrollando o si se encontraba muerto, razón por la cual no había presentado mucho crecimiento de las colonias fúngicas.

RESULTADOS

Obtención de las cepas del hongo

A pesar de que se trabajó con cepas que ya tenían cierto tiempo de haber sido aisladas, la etapa de regeneración no mostró mayores problemas en cuanto a la tasa de crecimiento, sin embargo uno de los mayores problemas fue la contaminación de los cultivos con una bacteria, la cual no se identificó.

Tratamientos

La contaminación de los cultivos también representó un problema durante la realización de esta fase; de los tres tratamientos que se evaluaron el que mayor número de réplicas contaminadas mostró fue el tratamiento A.

Durante esta etapa se observó que a pesar de tener mejor cantidad de inóculo a la hora de su cultivo las repeticiones del tratamiento C mostraron un crecimiento superior y más acelerado que las réplicas del resto de los tratamientos. Por su parte las réplicas del tratamiento B mostraban el desarrollo de pequeñas colonias alrededor de la porción de hongo que se inoculaba así como de las regiones por donde el inóculo hubiera rozado figuras 1, 2 y 3. Estas diferencias en el cultivo de los tratamientos impulsaron a que se montara una prueba de rendimiento en la producción de biomasa de los diversos medios de cultivo evaluados.

Al analizar las características fenotípicas de las colonias obtenidas en los distintos tratamientos de cultivo, se observa la diferencia entre el tratamiento C y los tratamientos A y B. El hongo que se logra desarrollar en el medio líquido tiene una apariencia de ser más húmedo que los demás. Además que las colonias son de color verde, mientras que en A y B son de color gris y rosado.



Figura 1. Colonias de *Mycosphaerella fijiensis* cultivadas en el tratamiento A
Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.



Figura 2. Colonias de *Mycosphaerella fijiensis* cultivadas en el tratamiento B
Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

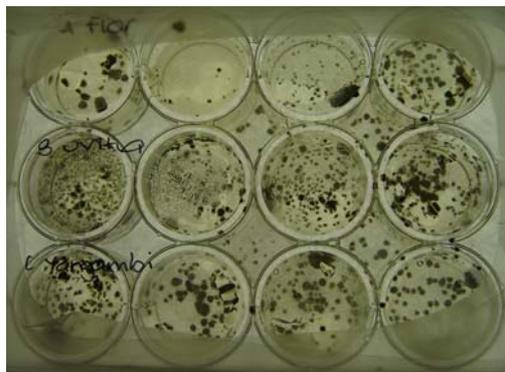


Figura 3. Colonias de *Mycosphaerella fijiensis* cultivadas en el tratamiento C
Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

Extracción de ADN

Las muestras que presentaron los mejores resultados eran las muestras del tratamiento C con 300 μ l de solución buffer. Una característica de los botones de ADN de las muestras con carbón activado era que se veía más oscuros que las muestra que no habían sido tratadas con carbón.

Electroforesis en geles de agarosa al 1% y cuantificación del ADN de las muestras

El cuadro 1 muestra las concentraciones de ADN que se estimaron para las muestras evaluadas en el tratamiento A. Las concentraciones de 1200 μ l y 1500 μ l presentaron el menor rendimiento, no obteniéndose en ninguna bandas de ADN (Figuras 8 y 9).

Las muestras con mayor cantidad de ADN fueron las evaluadas con 300 μ l y 600 μ l; las figuras 6 y 7 indican que las bandas que se obtienen para estas muestras son de mayor grosor y nitidez, que las que se obtienen para el resto de las réplicas, por lo cual la concentración de ADN estimada para estas extracciones resulta mayor que el resto. Para las muestras con carbón activado hubo una degradación del gel en los últimos cuatro pozos, lo cual no permitió hacer la estimación de la concentración de ADN de dichas muestras (Figura 4).

Para el tratamiento A los mejores resultados obtenido se presentaron en la muestras en la muestra con 300 μ l y 600 μ l de solución buffer (Cuadro 1)

Cuadro 1. Resultados obtenidos de la concentración de ADN (ng/μl) de las muestras evaluadas en el tratamiento A

Tratamiento A							
Sitio de muestreo	Pozo	Concentración de ADN (ng/μl)					
		Test con carbón	Test sin carbón	300 μl *	600 μl *	1200 μl *	1500 μl *
	Marcador						
Finca La Flor #3	1	30	60	90	100	-	-
	2	30	60	90	100	-	-
	3	30	60	90	100	-	-
	4	30	60	90	100	-	-
	5	30	60	90	100	-	-
Finca Uvita	6	30	60	90	100	-	-
	7	30	60	90	100	-	-
	8	30	60	90	100	-	-
	9	30	60	90	100	-	-
	10	30	60	90	100	-	-
Parcela Yangambi	11	30	60	90	100	-	-
	12	+	60	90	100	-	-
	13	+	50	90	100	-	-
	14	+	60	90	100	-	-
	15	+	-	90	100	-	-
	Marcador						

* Buffer de extracción - No se observa la banda + Muestra degradada
Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

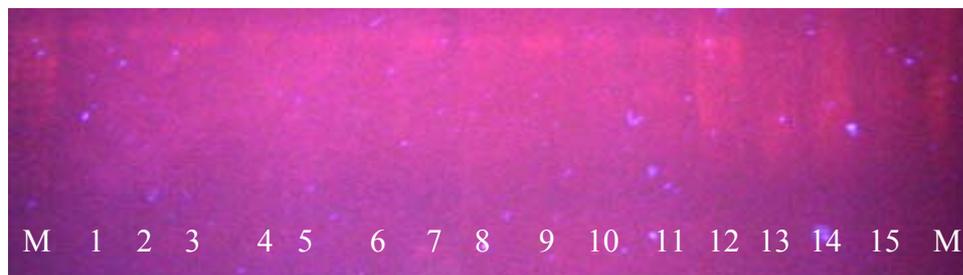


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras control con carbón activado tratamiento A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

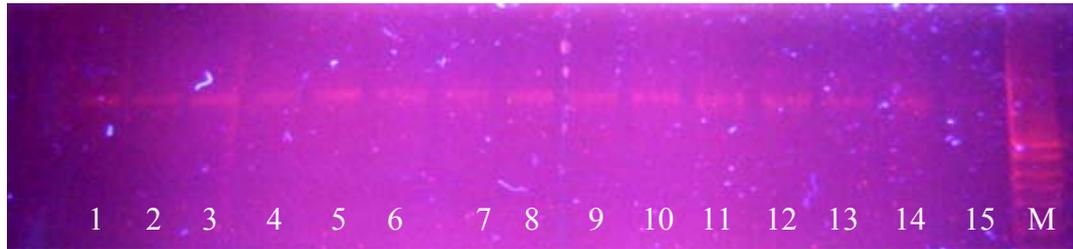


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras testigos sin carbón activado tratamiento A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.



Figura 6 . Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 300 µl de buffer de extracción tratamiento A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA



Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 600 µl de buffer de extracción tratamiento A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.



Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1200 μ l de buffer de extracción tratamiento A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.



Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1500 μ l de buffer de extracción tratamiento A

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

En el cuadro 2 se visualizan las concentraciones de ADN que se estimaron para las réplicas del tratamiento B. Las cantidades de ADN que se logran extraer son pocas en comparación con las obtenidas en el tratamiento A. Además el comportamiento de las muestras es muy inestable, ya que en algunas se logra extraer material genético y en otras las bandas ni siquiera están presentes. (Figuras 11, 12 y 13).

Uno de los resultados que más destacan en el cuadro 2 es el comportamiento de los diferentes volúmenes de buffer de extracción, es que a mayor cantidad de buffer utilizado es mayor la concentración de ADN que se obtiene (Cuadro 2). Este comportamiento

también se observa en las figuras 12, 13, 14 y 15, en donde conforme aumenta la cantidad de buffer de extracción, las bandas que se obtienen son más nítidas y de mayor grosor.

Los mejores resultados para este tratamiento se presentaron con 1200 μ l y 1500 μ l de buffer de extracción, donde se logró obtener una cantidad considerable de ADN, además de un comportamiento muy uniforme en la extracción (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados obtenidos de la concentración de ADN (ng/ μ l) de las muestras evaluadas en el tratamiento B

Tratamiento B							
Sitio de muestreo	Pozo	Concentración de ADN (ng/ μ l)					
		Test con carbón	Test sin carbón	300 μ l *	600 μ l *	1200 μ l *	1500 μ l *
	Marcador						
Finca La Flor #3	1	30	-	-	10	200	200
	2	30	-	-	40	200	200
	3	30	-	30	40	200	200
	4	30	-	30	40	200	200
	5	50	-	-	-	200	200
Finca Uvita	6	50	-	-	-	200	200
	7	50	40	30	40	200	200
	8	50	-	30	40	190	200
	9	50	-	30	-	190	200
	10	50	-	20	20	190	200
Parcela Yangambi	11	50	30	-	30	190	200
	12	10	30	-	-	190	200
	13	10	30	30	30	190	200
	14	30	30	20	30	190	200
	15	40	30	20	-	190	200
	Marcador						

* Buffer de extracción - No se observa la banda

Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras testigos con carbón activado tratamiento B

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA

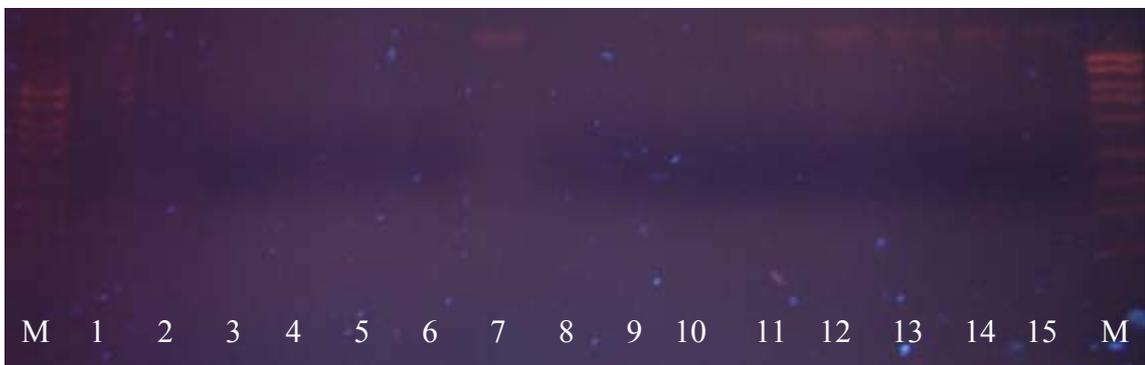


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras control sin carbón activado tratamiento B

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 300 µl de buffer de extracción tratamiento B

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

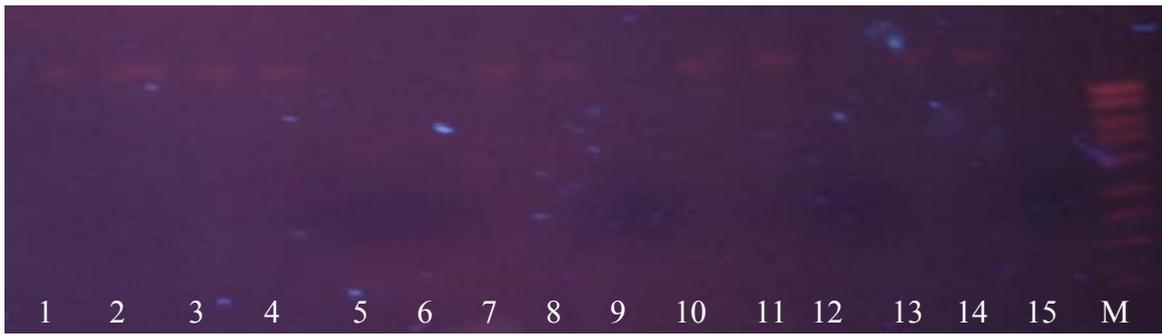


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 600 μ l de buffer de extracción tratamiento B

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

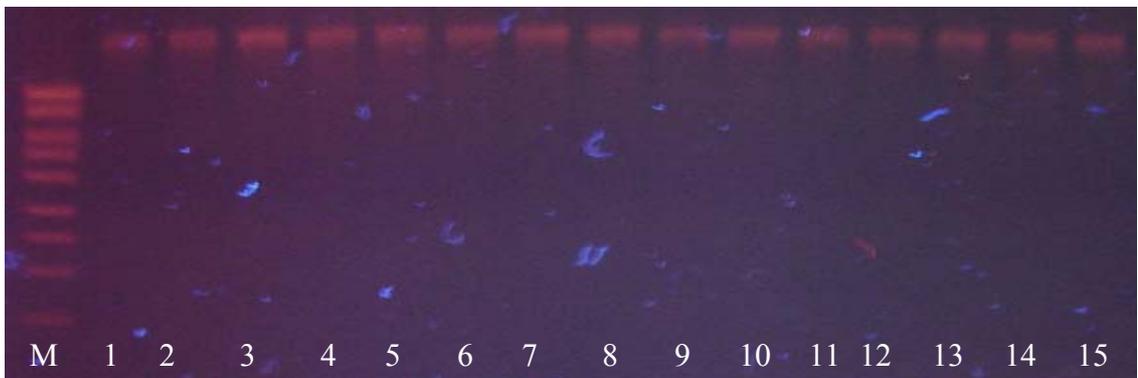


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1200 μ l de buffer de extracción tratamiento B

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

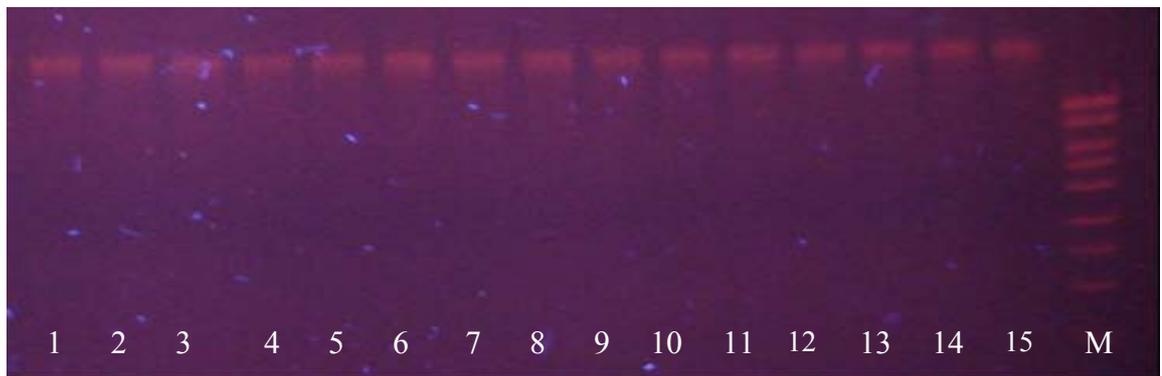


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1500 μ l de buffer de extracción tratamiento B

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

De las muestras evaluadas en el tratamiento C (Cuadro 3) al comparar los datos con los otros se observa que en todas las muestras se logra extraer ADN, factor que no se presenta en el resto de los tratamientos. Las muestras en este tratamiento se comportan de una forma muy estable y uniforme (Figuras 16,17,18,19,20 y 21).

Para este tratamiento los mejores resultados se presentaron en las muestras evaluadas con 300 μ l y 600 μ l de buffer, las bandas que se obtuvieron en las electroforesis de estas muestras se presentan en las figuras 18 y 19, donde se observa las bandas que tienen la característica de ser muy nítidas y de buen grosor.

Cuadro 3. Resultados obtenidos de la concentración de ADN (ng/ μ l) de las muestras evaluadas en el tratamiento C

Tratamiento C							
Sitio de muestreo	Pozo	Concentración de ADN (ng/ μ l)					
		Test con carbón	Test sin carbón	300 μ l *	600 μ l *	1200 μ l *	1500 μ l *
	Marcador						
Finca La Flor #3	1	60	100	200	160	40	30
	2	60	100	200	160	40	50
	3	60	100	200	160	40	50
	4	60	40	200	160	40	50
	5	60	40	200	160	40	50
Finca Uvita	6	60	50	200	160	40	50
	7	60	20	200	160	40	50
	8	60	40	200	160	40	50
	9	60	40	200	160	40	50
	10	60	20	200	160	50	50
Parcela Yangambi	11	60	40	200	160	50	50
	12	60	20	200	160	40	50
	13	60	100	200	160	40	50
	14	60	100	200	160	40	50
	15	40	100	200	160	50	30
	Marcador						

* Buffer de extracción

Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.



Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras control con carbón activado tratamiento C

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

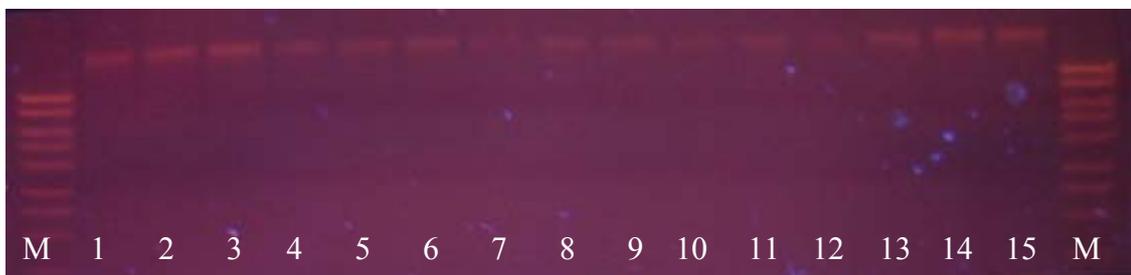


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras control sin carbón activado tratamiento C

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

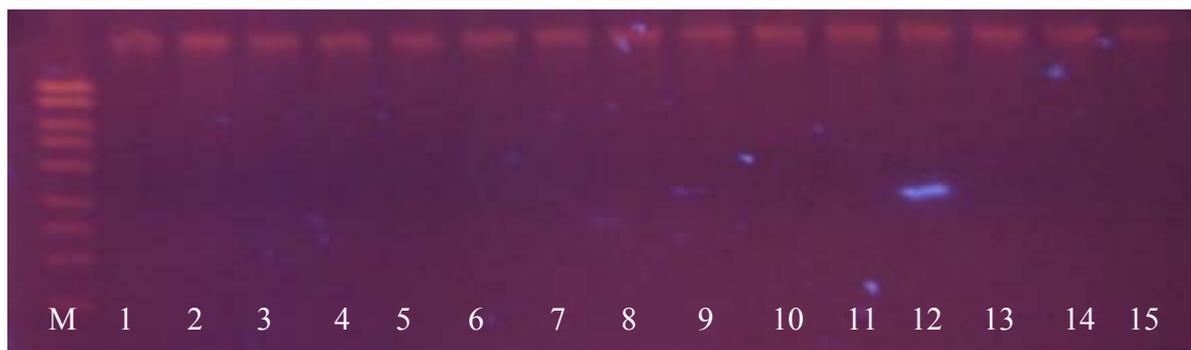


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 300 μ l de buffer de extracción tratamiento C

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.



Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 600 μ l de buffer de extracción tratamiento C

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

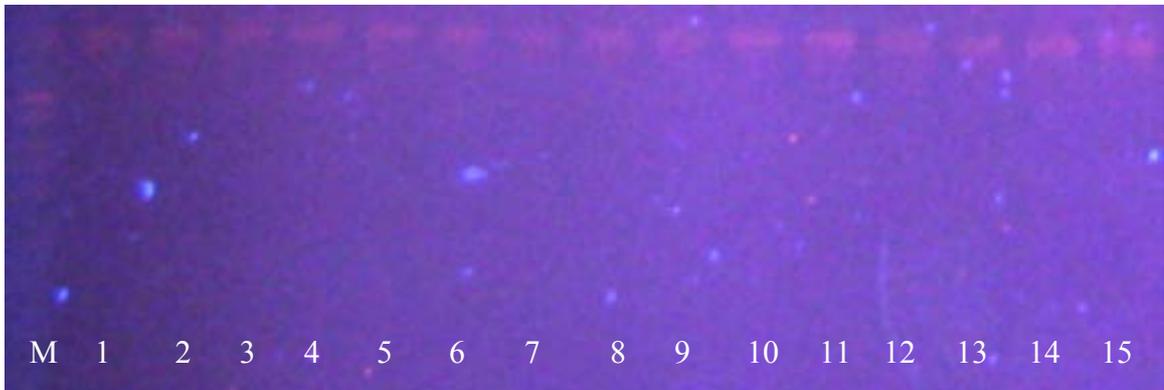


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1200 μ l de buffer de extracción tratamiento C

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

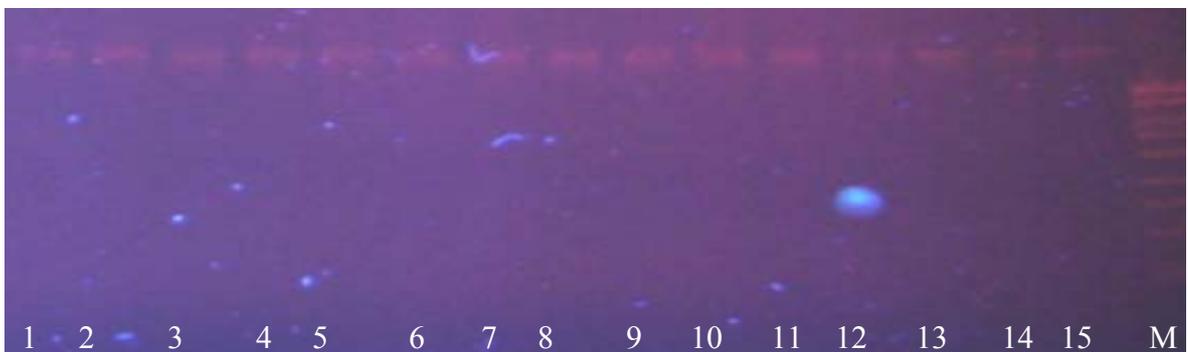


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras con 1500 μ l de buffer de extracción tratamiento C

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

Prueba preliminar de amplificación de ADN

Los resultados de las pruebas de amplificación se observan en la figura 22. Los pozos de 1 al 5, los cuales no se pueden visualizar porque no amplificaron, corresponden a las muestras control sin carbón activado, los pozos del 6 al 10 son las réplicas tratadas con carbón activado, los pozos del 11 al 15 corresponden a las muestras con 300 µl de buffer y del pozo 16 al 20 a las réplicas con 600 µl de buffer de extracción.

Las muestras que no fueron tratadas con carbón activado durante el proceso de extracción de ADN no amplificaron, por eso no se muestran en la figura, en cuanto al resto de los muestras las bandas que se obtienen en la amplificación son muy similares, siendo la de mayor intensidad una banda de 1500 pb, aproximadamente, tal y como se muestra en la figura 22. Entre todas las réplicas que se evaluaron los resultados que se observan con mayor nitidez corresponde a los obtenidos para las muestras tratadas con 300 µl de buffer.

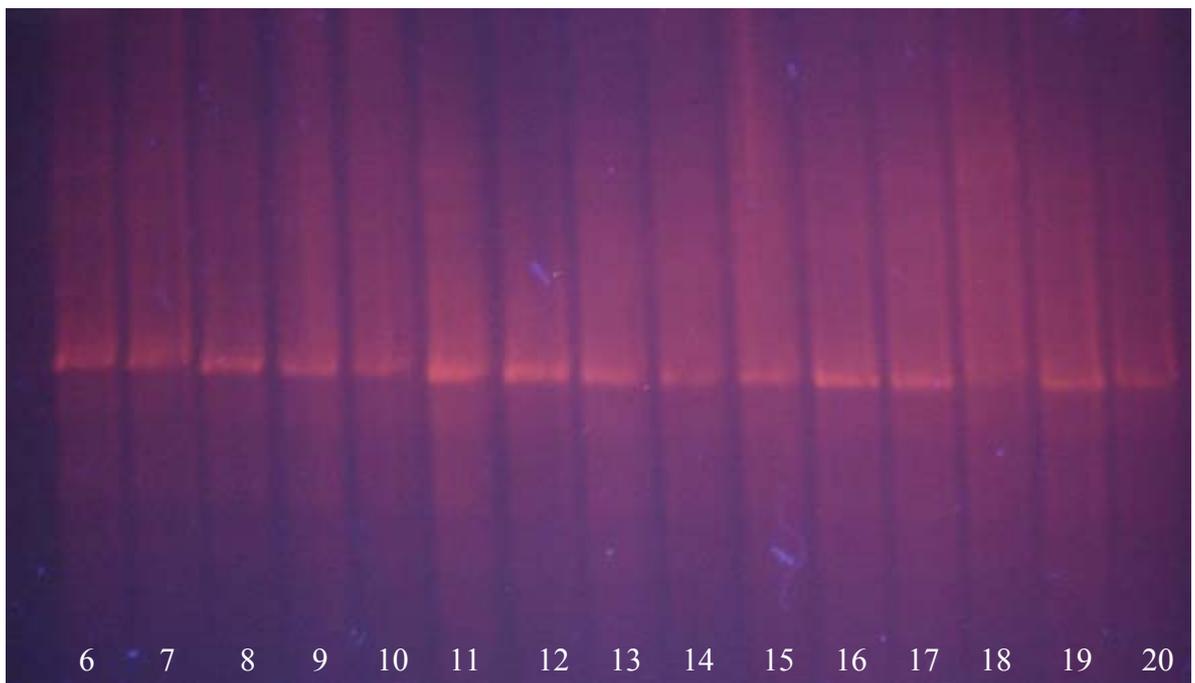


Figura 22. Resultado de la prueba de amplificación de las muestras tomadas al azar del tratamiento C

Fuente: Laboratorio de Biología Molecular, CORBANA.

Prueba de rendimiento en la producción de biomasa del hongo Mycosphaerella fijiensis en los distintos tratamientos analizados

El medio de cultivo que mayor contaminación mostraba, era el medio sólido en donde 6 de las 10 réplicas preparadas se contaminaron (Figura 23 y Cuadro 4). Por lo general la contaminación que se presentó fue por bacteria, la cual no se identificó.



Figura 23. Contaminación de las réplicas del tratamiento con medio sólido una semana después de su inoculación

Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

Cuadro 4. Réplicas contaminadas durante el desarrollo de la prueba de rendimiento de los medios

Contaminación de los tratamientos de cultivo		
Tratamiento	Una semana después de la inoculación	Dos semanas después de la inoculación
Medio Sólido	6	-
Medio Sólido + Filtro	-	-
Medio Líquido	-	-

Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

Al evaluar el crecimiento mostrado en los diversos tratamientos se determinó que desarrollo de colonias en el medio líquido y en el medio con filtro era superior al tratamiento con medio sólido (Figura 24). En el tratamiento con medio líquido y medio

sólido con filtro se desarrollan pequeñas colonias de *M. fijiensis* mientras en el medio sólido el crecimiento es prácticamente cero.



Figura 24. Crecimiento de colonias de *Mycosphaerella fijiensis* en los diversos tratamientos una semana después de la inoculación (medio líquido, medio sólido, medio con filtro)

Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

Como en el medio sólido el crecimiento de las colonias fúngicas era tan escaso se pensó que quizás a la hora de hacer el cultivo el tejido que se estaba inoculando podía haber muerto, razón por la cual el crecimiento presentado era tan pobre. Sin embargo, al evaluar el crecimiento al microscopio del medio sólido se observó el micelio del hongo *M. fijiensis* desarrollándose en el medio (Figura 25).

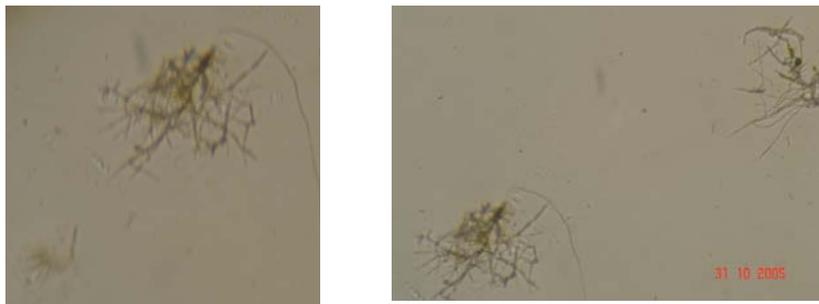
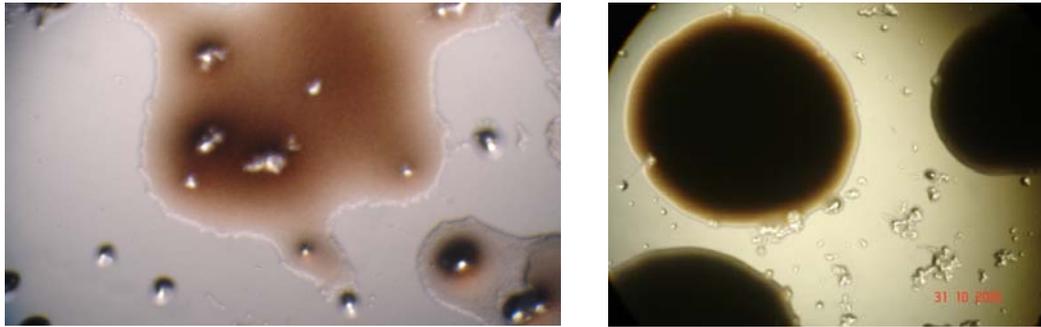


Figura 25. Fotografías al microscopio del desarrollo de las colonias de *Mycosphaerella fijiensis* en el tratamiento sólido

Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

A las réplicas del tratamiento sólido que presentaron contaminación también se les hizo un estudio al microscopio, para determinar si la colonias se habían logrado desarrollado o

habían sido inhibidas o exterminadas por los agente contaminantes. En la figura 26 A, muestra como las colonias en desarrollo del hongo son circundadas por el agente contaminante, mientras en la figura 26 B se ve como el crecimiento del contaminante prácticamente no permite el desarrollo de los micelios de *M. fijiensis*, debido a que se expande por todo el medio de cultivo.



A

B

Figura 26. Fotografías al microscopio de las réplicas que presentaron contaminación en el tratamiento con medio sólido

Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

Cuando se evaluó el crecimiento de los tratamientos dos semanas después de la inoculación. Se determinó que el tratamiento con el medio líquido y con el medio sólido con filtro mostraron los mayores crecimientos, mientras que en el medio sólido, en comparación a los demás, era prácticamente nulo (Figura 27).

Al comparar el crecimiento del medio líquido con el medio sólido con filtro, se ve que las colonias que se desarrollan en el medio de cultivo líquido son de color verde, mientras que las que se desarrollan en el medio sólido con filtro muestran un color gris y rosado (Figura 27). Otra de las diferencias entre los hongos de los diferentes tratamientos evaluados era que el hongo que se desarrollaba en el tratamiento C tenía una consistencia más húmeda que los que se desarrollaban en los otro cultivos.

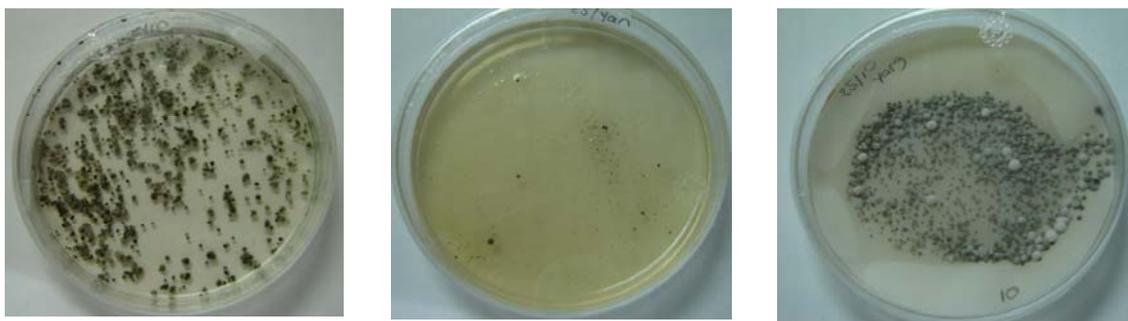


Figura 27. Crecimiento de las colonias de *M. fijiensis* a las dos semanas del cultivo (medio líquido, medio sólido, medio con filtro)

Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

Cuando se procedió a realizar la cuantificación de la cantidad de biomasa producida en las réplicas de los diversos tratamientos, se presentó el problema de que a las réplicas del tratamiento con medio de cultivo sólido no se les pudo realizar el estudio, esto debido porque el crecimiento presentado fue tan escaso que imposibilitó extraer las colonias sin que quedaran todas impregnadas de agar; esto sumado a que algunas eran tan pequeñas que al tratar de extraerlas se destruían.

Para el tratamiento líquido y sólido con filtro los resultados de la cuantificación de la biomasa se observó que el promedio de la cantidad de biomasa producida en el medio sólido con filtro es superior al medio líquido, tanto para el peso fresco como para el peso seco; sin embargo, la diferencia entre ambos, para el peso seco es mayor (Cuadro 5).

Cuadro 5. Peso fresco y peso seco de la biomasa producida en las diferente réplicas de los tratamientos analizados

Tratamiento	Réplica	Peso Fresco	Peso Seco
Medio líquido YEGK	1	0.0653	0.0265
	2	0.0842	0.0344
	3	0.1077	0.0369
	4	0.1477	0.0667
	5	0.0509	0.0152
	6	0.1153	0.1340
	7	0.0668	0.0239
	8	0.063	0.0289
	9	0.0588	0.0234
	10	0.0524	0.0109
	Promedio	0.08121	0.0401
Medio sólido con filtro	1	0.0933	0.0778
	2	0.0670	0.0535
	3	0.0740	0.0601
	4	0.0555	0.0411
	5	0.0889	0.0745
	6	0.0823	0.0682
	7	0.0783	0.0646
	8	0.0941	0.0773
	9	0.1179	0.1011
	10	0.1010	0.0846
	Promedio	0.08523	0.07028

Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

Al aplicar la prueba t a los datos analizados, se determinó que entre los pesos frescos de los tratamientos no existía diferencia significativa, esto por que la probabilidad que se obtuvo se consideró lo suficientemente grande como para decir que entre los datos no existe diferencia significativa. Para el peso seco de las muestras la probabilidad que arroja la prueba t se consideró lo suficientemente pequeña para decir que si existe diferencia entre los datos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de los resultados obtenidos en la prueba de rendimiento de los medios utilizando la prueba t

Tratamiento	Peso Fresco		Peso Seco	
	Medio Líquido YEGK	Medio Sólido con Filtro	Medio Líquido YEGK	Medio Sólido con Filtro
Promedio	0.0812	0.0852	0.0401	0.0703
Desviación estándar	0.0322	0.0179	0.0363	0.0168
Prueba t	0.7340		0.0283	

Fuente: Laboratorio de Fitopatología, CORBANA.

DISCUSIÓN

Extracción de ADN y Electroforesis en geles de agarosa al 1%

La concentración de ADN, presente en las muestras evaluadas, fue estimada mediante el análisis de las bandas obtenidas con las electroforesis por medio de un marcador molecular MassRuler™ DNA Ladder High Range, el cual se colocaba junto a las muestras que se ponían a migrar.

Para determinar la pureza de las muestras se veía la nitidez de las bandas obtenidas, la degradación del material genético o los posibles barridos que se pudieran generar durante la electroforesis.

Según Valadez y Kahl (2000) la determinación de la calidad del ADN se suele hacer con base en el grado de degradación, ya que un ADN de alto peso molecular aparece como una banda definida en la parte superior del gel a poca distancia de los pozos, mientras que el material parcialmente degradado forma un barrido de fragmentos pequeños a lo largo del pozo. De acuerdo con esta información y al analizar las figuras de los geles de agarosa de los tratamientos evaluados se observa que las bandas con un ADN de mejor calidad son las que se presentan para las muestras tratadas con 1200 μ l y 1500 μ l de buffer pertenecientes al tratamiento B y las réplicas con 300 μ l y 600 μ l de buffer pertenecientes al tratamiento C.

Sin embargo no se puede decir que el resto de las muestras no tengan ADN de buena calidad ya que en la mayoría las electroforesis, de las muestras en las cuales se logró extraer ADN, las bandas obtenidas prácticamente no presentan barridos, factor que indica que casi no hay presente mucha contaminación (Valadez y Kahl; 2000). Además este resultados es de suma importancia tomando en cuenta que no se hizo uso de ARNas. La única electroforesis que presenta barridos corresponde a los últimos pozos de las muestras control con carbón activado (figura 4) del tratamiento A, los resultados se pueden deber a defectos meramente de la electroforesis, a que se presentara una degradación del gel cuando se pusieron a migración de las muestras.

Al obtener bandas de ADN con un nivel de pureza muy alto se comprueba que el uso del CTAB como detergente en las extracciones de ADN permite obtener ADN de alta pureza molecular (Lodhi *et al.*, 1994; Rogers y Bendich, 1998; Chen y Ronald, 1999; Mygind *et al.*, 2003; Aguirre *et al.*, 2003).

El objetivo principal de esta investigación consistía en generar un protocolo eficiente de extracción de ADN del hongo *M. fijiensis*, evaluando variables como rendimiento, calidad y eficiencia. La calidad de un material genético obtenido va a estar influenciada por el protocolo así como del tipo de tejido que se utilice. De ahí que sea de suma importancia la selección del método que mejor se ajuste a los objetivos del trabajo a realizar (Lodhi *et al.*, 1994, Madriz, 2005).

A través de esta investigación se logró comprobar que utilizando hongos desarrollados en medio líquido YEGK y utilizando una pequeña cantidad de 300 μ l de solución buffer, durante el proceso de extracción, se logra obtener ADN de alto peso molecular. Se demostró que para las extracciones de ADN de *Mycosphaerella fijiensis* no se requiere el uso de glucanex; preparado enzimático que es utilizado para eliminar β 1-3-1,6 glucanos fúngicos contaminantes (Birch, 1998), aspecto que se traduce en ahorro de dinero y tiempo. Otro de los aspectos beneficiosos de esta optimización es que se logra determinar que para las extracciones de ADN de *M. fijiensis* no es necesario el uso de ARNas. Sin embargo se recomienda que se realicen estudios que determinen si se requiere su uso en otras técnicas moleculares.

Prueba preliminar de amplificación

Las muestras que se trataron con carbón activado fueron las que mostraron una buena amplificación, mientras que las que no se trataron con carbón activado prácticamente no mostraron amplificación. Los resultados que se obtuvieron coinciden con los reportados por Vroh *et al* 1996, en donde se reporta que el uso de carbón activado durante el proceso de extracción de ADN mejora significativamente los resultados que se obtienen en las pruebas de amplificación.

Visualmente no se pueden ver muchas diferencias entre las bandas que amplificaron, nada más se debería hacer un ajuste para lograr obtener más nitidez de las muestras que se evalúan.

Prueba de rendimiento en la producción de biomasa del hongo Mycosphaerella fijiensis en los distintos tratamientos analizados

Las diferencias en los distintos medios de cultivo se deben a que el ambiente en el cual se desenvuelva un organismo va a influir en las características fenotípicas que muestre (Klug y Cummings, 1999). Es por eso que las colonias que se desarrollan en medio líquido y en medio sólido con filtro adquieren distintas coloraciones, a pesar de ser el mismo hongo.

Las diferencias obtenidas entre los pesos fresco y seco de los tratamientos con medio líquido y medio con filtro se deben a la cantidad de agua que absorbe el hongo al estar en contacto directo con el medio de cultivo. Al estar *M. fijiensis* en el tratamiento C en contacto directo y constante con el medio lo convierte en colonias muy suculentas que al ser sometidas al calor de la estufa pierden toda la humedad que tenían, lo que disminuye significativamente el peso; efecto que no ocurre en el tratamiento B en donde el hongo al no estar en contacto directo con el medio no se vuelve tan suculento y húmedo por lo que no posee mucho líquido que perder al ser sometido a la estufa. Surge la hipótesis que el filtro funciona como una especie de barrera que delimita la absorción de líquidos por parte del hongo, el cual aumenta de peso por la formación de cuerpo vegetativo y no a través de la absorción de líquidos.

Además los resultados que arrojó el medio con filtro, al mantener su promedio para peso fresco y peso, hace surgir la hipótesis que el filtro al humedecerse con el medio de cultivo crea un ambiente de alta humedad que brinda condiciones óptimas para el desarrollo del hongo; ya que como se mencionó antes *Mycosphaerella fijiensis* es un hongo que se desarrolla de forma excelente bajo condiciones de alta humedad (González y Jaramillo, 1979).

Al analizar los resultados de las pruebas de electroforesis de los tratamientos B y C y

determinar que en el tratamiento con medio de cultivo sólido con filtro requiere una mayor cantidad de buffer de extracción que el tratamiento con medio de cultivo líquido, surge la hipótesis de que *Mycosphaerella fijiensis* desarrolla menor cantidad de quitina en medio líquido que en medio sólido con filtro, razón por la cual se requiere una menor cantidad de solución buffer para destruir el tejido.

Los resultados que arrojó el medio con filtro al mantener su promedio en las dos variables evaluadas hace surgir la hipótesis de que al ser *Mycosphaerella fijiensis* un hongo que se desarrolla de forma excelente bajo condiciones de humedad (González y Jaramillo, 1979) el filtro al humedecerse con el medio de cultivo crea un ambiente de alta humedad que permite que el hongo se desarrolle de forma muy efectiva.

CONCLUSIONES

- La presente investigación logró su objetivo principal el cual era optimizar un protocolo de extracción de ADN para *Mycosphaerella fijiensis*, ya que se logró demostrar que con usar una cantidad de micelio de aproximadamente 0.03 g con 300 μ l de buffer de extracción se logran excelentes resultados, lo cuales se pueden emplear exitosamente en pruebas moleculares.
- Al analizar los datos de las electroforesis de todos los tratamientos que se evaluaron en la presente investigación, se concluye que el uso en las extracciones de ADN el medio líquido con la concentración de 300 μ l de buffer de extracción es el mejor ya que se obtiene una excelente cantidad de ADN de alto peso molecular y pureza, además se logra disminuir significativamente la cantidad de buffer, lo que se traduce en ganancias para la empresa.
- El uso del CTAB como detergente en el buffer de extracción permite obtener productos de ADN de alto peso molecular, esto tomando en cuenta que para esta investigación no se utilizaron ARNasas y de preparados enzimáticos como el glucanex. El determinar que para las extracciones de ADN de *M. fijiensis* no es necesario hacer uso de estos dos reactivos, se traduce en ahorro de tiempo y de dinero.
- Las prueba preliminar de amplificación indica que el uso del carbón activado, para el primer M4, ayuda a obtener mejores resultados en las amplificaciones. Este resultado es de suma relevancia ya que esta investigación es la base para futuras investigaciones que se van a realizar en CORBANA, como los son las caracterizaciones de nemátodos y de diversas cepas de *M. fijiensis* por medio de marcadores moleculares. Sin embargo este resultado es meramente preliminar por lo que se recomienda investigar con otros primer y otras técnicas moleculares.
- Por medio de la prueba de rendimiento en la producción de biomasa del hongo se logra concluir que los tratamientos con medio de cultivo líquido y sólido con filtro

corresponden a los mejores resultados, a través de ellos se obtiene una producción masiva del hongo en un corto lapso de tiempo.

- Se logra determinar que el cultivo del hongo *Mycosphaerella fijiensis* en medio sólido con agar no es el más adecuado, ya que su uso demanda mucho tiempo e inversión de más medio de cultivo del que se necesita.
- Se determina que dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura, medio de cultivo) en las cuales se desarrolle el hongo así van a ser las características fenotípicas que muestre; surgiendo la hipótesis que tienden a desarrollar más cuerpo vegetativo al desarrollarse en medio sólido con filtro que en medio líquido.
- A través del presente trabajo se logró disminuir la cantidad de buffer de extracción así como determinar los medios más adecuados para el crecimiento de *M. fijiensis*, lo cual para la empresa se traduce en ganancias de tiempo y de dinero, obteniendo excelentes resultados.

RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- Que las metodologías que se utilizan en el Laboratorio de Fitopatología de la Corporación Bananera Nacional en torno al cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* se modifiquen y se implemente el uso del medio líquido YEGK, así como del medio sólido Mycophil-Agar con filtro. Estos pueden ser la solución a los problemas de contaminación y lento crecimiento que presenta el medio común que se utiliza. Sin embargo por la fácil manipulación del medio con filtro se recomienda que se emplee este método, sino es para pruebas moleculares.
- Para los análisis moleculares, se recomienda el uso del medio líquido debido a que muestra un crecimiento muy acelerado y además no requiere más que de 300 µl de buffer de extracción para obtener un ADN de excelente calidad. Aunque el medio con filtro mostró un crecimiento muy acelerado, no se recomienda para los análisis moleculares ya que se necesitan 1500 µl de buffer de extracción para obtener los mismos resultados que se obtienen con 300 µl de buffer en el medio líquido.
- Para las pruebas de amplificación es importante que se realicen ajustes para obtener resultados más nítidos y reproducibles.
- Se recomienda que se prueben diferentes primers que demuestren que el uso del carbón activado ayuda a obtener mejores resultados en las pruebas de amplificación.
- Para las pruebas de amplificación se recomienda que se realicen estudios para determinar si es necesario el uso de ARNas para obtener excelentes resultados. Ya que si se logra demostrar que no se requiere este reactivo la empresa se ahorraría mucho dinero en la empresa.

- Otra de las recomendaciones consiste en determinar la cantidad óptima de carbón activado que se debe emplear para las extracciones de ADN, con el fin de ahorrar dinero a la empresa, ya que se puede estar usando más cantidad de la que se necesita.
- Se recomienda que se realicen estudios que determinen el porque el hongo *M. fijiensis* se desarrolla más rápidos en medios líquidos y sólidos con filtro, porque de esta manera se puede conocer mejores las condiciones óptimas para su desarrollo y atacarlo por medio de esta perspectiva.

BIBLIOGRAFÍA

- AILA. 2004. Banano: Costa Rica y Ecuador realizarán acciones conjuntas. (http://www.ailaonline.org/Pages/paises_noticias.ihtml?noticiaid=144&logo=n-ecuador.gif&pais=ECUADOR) <2-6-04>.
- Aguirre, M; Castaño, J y Zuluaga, L. 2003. Método rápido de diagnóstico de *Mycosphaerella musicola* leach y *M. fijiensis* morelet, agentes causantes de las sigatokas amarilla y negra. Rev. Acad. Colomb. Ciencias. 27(105): 619-623.
- Birch, M and Denning, D. 1998. Comparison between five lysing enzyme preparations on protoplast formation in *aspergillus fumigatus*. (http://www.aspergillus.man.ac.uk/secure/laboratory_protocols/birch.htm) <25-1-06>.
- Buro, R; Zuñiga, C y Madriz, J. 2001. Extracción de ADN de *Mycosphaerella fijiensis* provenientes de diferentes aislamientos colectados en Costa Rica. Tecnología en Marcha.
- Carlier, J. 2004. Population genetic structure and dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*. Infomusa. 13 (2): 17-20
- Carlier, J; Mourichon, X; González-de-León, D; Zapater, M and Lebrum M. 1994. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that causes banana leaf spot diseases. Phytopathology 84: 751-756
- Chen, D; Ronald, P.C. 1999. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. Plant Molecular Biology Reporter 17: 53-57.
- Conarefi, 1995. Estado de los Recursos Fitogenéticos en Costa Rica (Propuesta de Costa Rica a FAO, 1995). Capítulo 3. <http://www.conarefi.ucr.ac.cr/Series/Propuesta1.3.1.htm> (10-7-05)
- Ferreira, W. 2001. UITA Secretaría Regional Latinoamericana. Noticias: el mundo del banano. (<http://www.rel-uita.org/sectores/banano/noticias.htm>) <2-6-04>.

Gavilán, J. 1995. Principales plagas y enfermedades del banano. (<http://bananasite.galeon.com/plagas.html>) <10-5-05>.

González, M. & Jaramillo, R. 1979. Sigatoka Negra. Rev. ASBANA, Asociación Bananera Nacional de Costa Rica. 3(10): 3,7-10.

INIBAP, 2002. INIBAP en el año 2002. (http://www.inibap.org/pdf/2002resum_es.pdf) <12-7-05>

Jacome, L; Lepoivre, P; Marin, D; Ortiz, R; Romero, R and Escalant, J.V. 2002. *Mycosphaerella* leaf spot of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2 nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. 298 pp

Johanson, A; Crowhurst, R; Rikkerink, E; Fullerton, E y Templeton, M. 1994. The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. Plant Pathology. 43:701-707

Kim, C.; Lee, C.; Shin, J.; Chung, Y. y Hyung, N. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. 1085-1087 pp

Klug, W; Cummings, M. 1999. Conceptos de Genética. Traducido: Ménsua, J.L. y Bueno, D. Ed. Prentice Hall. Iberia, S.R.L. 5ª Ed. 815 pp.

Lodhi, M., Guang-Ning, Y., Weeden, N; Reisch, B. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Molecular Biology Reporter 12: 6-13

Mathews, C; Van Holde, K. 1998. Bioquímica. 2 ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1283 pp.

Madriz, K; Peraza, J. 2005. Manual de Laboratorio Biología Molecular. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. pp 49.

Mygind, T.; Østergaard, L.; Birkelund, S.; Lindholt, J; Christiansen, G. 2003. Evaluation of five DNA extraction methods for purification of DNA from atherosclerotic tissue and estimation of prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in tissue from a Danish population undergoing vascular repair. *BMC Microbiology*. 3:19

Nakyanzi, M. 2002. Molecular and pathogenic diversity of isolates of *Mycosphaerella fijiensis* that cause black Sigatoka disease of bananas in East Africa. Thesis PhD. University of Greenwich. Resources Institute.

Osava, 2003. La guerra del banano contra los hongos. Tierramérica. (<http://www.tierramerica.net/2003/0223/acentos.shtml>) <12-7-05>

Pineda, J; Carrasco, A; Cardona, R y Cooz, R. 1997. Presencia de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en las principales zonas plataneras de Venezuela. *Bioagro*. 9(2): 52-60

Rivas, G; Zapater, M; Abadie, C and Carlier, J. 2004. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*. 13: 471-482.

Rogers, S; Bendich, A. 1998. Extraction of DNA from plant tissue. *Plant Molecular Biology Manual A6*: 1-10.

Senasa, 2003. Sigatoka Negra del plátano. (http://www.senasa.gob.pe/sanidad_vegetal/programas_fitosanitarios/ci_sigatoka_negra_platano/sigatoka_negra_platano.htm) <12-6-05>

Smith, C y Wood, E. 1998. Biología molecular y biotecnología. Adisson-Wesley Iberoamericana. Estados Unidos de América. pp 989.

Valadez, E; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas: teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Pressa Mexico, S.A de C.V. Mexico, D.F. 147 pp.

Vargas, G. 1999. ¿Hay crisis bananera en Costa Rica?.
(<http://www.sica.gov.ec/cadenas/banano/docs/LA%20CRISIS%20DEL%20BANANO.htm>
) <2-6-04>.

Vroh, I; Harvengt, A; Chandelier, G; Mergeai, G and Jardin, P. 1996. Improved RADP amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding*. 115: 205-206

ANEXOS

Anexo 1. Diferentes enfermedades que afectan el cultivo del banano

Enfermedad	Microorganismos que la causa	Manera de esparcirse	Genotipos de Musa que infecta	Regiones más afectadas
Marchitamiento bacteriano	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Por medio del suelo, herramientas e insectos infectados	Bananos para postres, ABB, bananos de cocina	América Latina, Filipinas, India
Pudrición de las raíces	<i>Erwinia sp</i>	Por medio del suelo, e insectos infectados	Bananos para postres y ABB	Pacífico, Sureste de Asia, América Central
Bunchy top	<i>Banana bunchy top</i>	Por medio del áfido <i>Pentalonia nigronervosa</i>	Bananos para postres	Asia, Australia, Burundi, Rwanda, Zaire
Virus streak	<i>Banana streak badnavirus</i>	No se sabe pero probablemente por medio de chinches	La mayoría de genotipos de <i>Musa</i>	Todo el mundo
Marchitamiento por <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Por medio del suelo y herramientas contaminadas	Grupo Cavendish	Todo el mundo
Sigatoka Amarilla y Negra	<i>M. musicola</i> y <i>M. fijiensis</i>	Viento y la lluvia	La mayoría de genotipos de banano	Todo el mundo

Fuente: Nakyanzi, 2002

Anexo 2. Metodología recomendada para la extracción de ADN del hongo

Mycosphaerella fijiensis

1. Con una aguja de disección tomar una porción de una colonia de e inocularla en 3 ml de medio líquido YEGK (2 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 3 g de KNO₃ y 2 g de KH₂PO₄ por litro, pH 6), e incubar a 26 °C por 15 días.
2. Tomar las colonias desarrolladas y lavarlas con agua destilada estéril, con el fin de eliminar el medio de cultivo.
3. Tomar 0.03 g de micelio y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
4. Adicionar 100 µl de buffer de extracción 2X CTAB y con la ayuda de un pistilo macerar el micelio del hongo.
5. Adicionar 200 µl de buffer de extracción y 25 mg de carbón activado a la muestra. Agitar fuertemente en vortex (1900 rpm).
6. En la cámara extractora de gases adicionar 2 µl de mercaptoetanol y agitar fuertemente en vortex (1900 rpm).
7. Incubar la mezcla a 65 °C por un periodo de 60 minutos, en un Baño María.
8. Dejar enfriar la muestra por 4 minutos.
9. A temperatura ambiente se adicionan 400 µl de cloroformo : isoamil alcohol (24:1) y se agita fuertemente la muestra con vortex (1900 rpm).
10. Se centrifuga la muestra a 13000 rpm por 5 minutos; posteriormente con la ayuda de una micropipeta de 1 ml se transfiriere el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se repite el paso 9 y 10.
11. Al sobrenadante que se obtiene se le adiciona un volumen de isopropanol (-20 °C) para precipitar el ADN. La muestra se deja reposar en el congelador durante toda una noche.
12. Se toma la muestra y se centrifuga a 13000 rpm por 5 minutos y se elimina el isopropanol.
13. Se adicionan 150 µl de alcohol al 70% frío, se agita levemente y se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos, invirtiendo el tubo se elimina el alcohol. Este paso se repite y se deja secar la muestra a temperatura ambiente.
14. El ADN obtenido se resuspende en 100 µL de TE (0.5 M, pH 7.4 y oscuridad).
15. Si la solución se va a conservar por un largo periodo se debe almacenar a -20 °C, de otra manera a 4 °C.

Anexo 3. Preparación de los diferentes reactivos empleados en el proceso de extracción del ADN

EDTA 0.5M pH=8

Adicionar 93 g de etilendiaminotetrecetato (EDTA) disódico dihidratado (PM=372.2) en un erlenmeyer de 1 litro y aforar hasta 500 ml con agua destilada. Agite vigorosamente y ajuste el pH a 8.0 con NaOH. La solución puede conservarse en la refrigeradora (5°C) por periodos relativamente cortos (6 meses). Antes de volverse a usar es conveniente corroborar el pH de la solución a temperatura ambiente.

Tris-HCL 1M pH=8

Disolver 121.1 g de Tris base en 500 ml de agua destilada. Aforar a 1 litro y ajustar pH a 8.0 con HCL concentrado. La solución puede conservarse en la refrigeradora (5°C) por periodos relativamente cortos (6 meses). Para la preparación de ésta solución se deben tener en cuenta:

1. Si la solución resulta con un color amarillento debe descartarse y conseguir un Tris de mejor calidad o un recipiente más reciente.
2. Verificar muy bien el pH.
3. Tener en cuenta que el pH de la solución depende de la temperatura, decreciendo en 0.03 unidades por cada grado centígrado en que se incremente la temperatura.

Buffer TE

Solución	Concentración	Volumen Total		
		100 ml	150 ml	200 ml
EDTA 0.5M	1 mM	0.2 ml	0.3 ml	0.4 ml
Tris-HCL 1M	10 mM	1.0 ml	1.5 ml	2.0 ml
H ₂ O Destilada (Aforar)		100 ml	150 ml	200 ml
Ajuste con HCL al pH deseado				

Buffer TBE 0.5 X

1. Prepare una solución 5X de TBE de acuerdo con las proporciones que se indican a continuación. Para evitar que precipite, almacene en botellas de vidrio a temperatura ambiente, descartando cualquier botella que muestre precipitados.

Solución	Volumen Total	
	0.5 L	1.0 L
EDTA 0.5 M pH=8	10 ml	20 ml
Tris Base pH=8	27 g	54 g
Ácido Bórico	13.8 g	27.5 g
H ₂ O Destilada (Aforar)	0.5 L	1.5 L

2. Prepare 2.5 L de una solución 0.5X agregando 250 ml de TBE 5X en 2.250 ml de agua destilada. Esta solución es 0.045 M en Tris-Borato y 0.001 M en EDTA.

“Loading buffer” Bpb

Solución	Volumen
Azul de bromofenol (Bpb)	100 µl
Glicerol	500 µl
EDTA 0.5 M pH=8	100 µl
H ₂ O Destilada (Aforar)	10 ml

Buffer de extracción 2X CTAB

Reactivo	Concentración	0.5 L	1.0 L
Trisma-base	100mM	6.05 g	12.11 g
EDTA, Disodium	20mM	3.72 g	7.44 g
NaCl	1,4M	40.90 g	81.81 g
CTAB	2% (P/V)	10 g	20 g
PVP	1%	5 g	10 g