

NOTA TÉCNICA

Identificación molecular de aislados cubanos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Michel Leiva-Mora*, Orelvis Portal, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Cynthia Sánchez-García, Luis Emelio Rojas, Berkis Roque

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas.
Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara. CP 54 830. Villa Clara, Cuba.

RESUMEN: El objetivo del presente trabajo consistió en identificar molecularmente aislados de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, obtenidos de hojas de bananos infectadas del cultivar susceptible Grande naine. Para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizaron oligonucleótidos específicos (MF137 y R635) para *M. fijiensis* correspondientes a las regiones del ADN ribosomal (ADNr). Los nueve aislados mostraron una banda de aproximadamente 1018 pb, la que correspondió con el tamaño esperado. Este resultado constituye el primer informe de la identificación molecular de aislados monoasospóricos de *M. fijiensis* en Cuba. Esto podría contribuir al establecimiento de colecciones de cultivos de este hongo fitopatígeno adecuadamente identificadas.

Palabras clave: genes nucleares ribosomales, regiones ITS, Sigatoka negra.

Molecular identification of Cuban isolates of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

ABSTRACT: The aim of this work was to identify isolates of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet obtained from infected leaves of Grande naine. Specific oligonucleotides (MF137 y R635) for *M. fijiensis* were used to amplify the ADNr (ITS1) by the polymerase chain reaction (PCR). A band of approximately 1018 pb corresponding with the expected size was observed in the nine isolates. This is the first report of molecular identification of Cuban *M. fijiensis* monoasporic isolates and this result will help to establish appropriately identified culture collection.

Key word: black Sigatoka, ITS regions, nuclear ribosomal genes.

La identificación del agente causal de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) se basó tradicionalmente en la presencia de una cicatriz en la base de sus conidios. También, se utilizaron las características culturales de las colonias y en menor medida la sintomatología observada en campo, la cual es similar tanto para *Mycosphaerella musicola* (R. Leach ex J.L. Mulder) como para *M. fijiensis* (1).

También, se emplearon análisis isoenzimáticos para la identificación de *M. fijiensis*. Sin embargo, el

desarrollo y crecimiento no uniforme de los aislados, así como la actividad débil de los sistemas isoenzimáticos utilizados, condujeron a la obtención de resultados no reproducibles (2). Otros autores utilizaron ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA, con el uso de anticuerpos monoclonales, para el diagnóstico presintomáticamente de *M. fijiensis* (3).

Las técnicas moleculares, basadas en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron utilizadas con frecuencia para

*Autor para correspondencia. E-mail: michel@ibp.co.cu

garantizar un mayor nivel de confiabilidad en la identificación de *M. fijiensis* (4). Estas, permiten diferenciar a especies muy emparentadas como *M. fijiensis*, *M. musicola* y *Mycosphaerella eumusae* Crous & Mour.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar aislados monoascospóricos de *M. fijiensis* utilizando la región espaciadora del ADN ribosomal, en particular las regiones 18S, 5.8S y 25 S.

Para ello, se utilizaron nueve aislados de *M. fijiensis* pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas, perteneciente a la Universidad Central «Marta Abreu» de Las Villas (Cuba).

El ADN genómico se extrajo a partir de 50 mg de micelio liofilizado mediante el protocolo DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Alemania), acorde con las especificaciones de los fabricantes. La cantidad del ADN fue determinada espectrofotométricamente (Eppendorf BioPhotometer, Alemania), utilizando el valor de absorbancia a 260 nm. Para verificar su integridad, se tomaron 2 µl del ADN y se efectuó una electroforesis en un gel de agarosa 0,8% en tampón 1X TBE, y posteriormente se realizó la tinción con bromuro de etidio. Una vez confirmada su integridad se procedió a realizar los ensayos de PCR.

Para la amplificación por PCR se utilizaron los oligonucleótidos específicos para *M. fijiensis*: MF137 5'-GGCGCCCCGGAGGCCGTCTA-3', situado el espacio de transcripción interna (ITS, por sus siglas en inglés), localizado específicamente entre la región ribosomal 18S y 5.8S (2) y R635 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (5), situado en la región 25 S del ADN ribosomal. Estas permiten amplificar un fragmento de ADN de 1018 pb.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un tampón constituido por 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl pH 8,3 que contenían la mezcla de reacción 200 µM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Pharmacia), 200 nM de los oligonucleótidos MF137 y R635, así como una unidad de *Taq* ADN polimerasa (Boehringer Mannheim, Alemania) y 0,5 µl de ADN (50 ng.µl⁻¹) utilizado como molde. El volumen final de reacción fue de 50 µl. La amplificación del ADN se efectuó en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania) programado de la siguiente forma: 94°C (3 min), luego 35 ciclos de: 94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 2 min; seguido de un ciclo de 72°C (5 min).

Los productos amplificados fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa 0,8% en tampón 1X TBE, y posteriormente se realizó la tinción con bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron con un densitómetro de imágenes modelo Gel Doc 2000 (Biorad, EE.UU.).

Para cada uno de los nueve aislados de *M. fijiensis*, se obtuvo una banda de aproximadamente 1018 pb que se correspondió con el tamaño esperado para este hongo fitopatógeno utilizando los oligonucleótidos específicos MF137 y R635 (Fig. 1) y esto confirmó que todos los aislados utilizados pertenecían a esta especie.

Las regiones ITS del ADN ribosomal se utilizaron preferiblemente para realizar análisis filogenéticos de los géneros *Mycosphaerella* y sus anamorfos (8), así como para determinar la diversidad genética de poblaciones de *M. fijiensis* (9; 10).

Otros autores recurrieron al uso de otras regiones informativas del ADN para el diagnóstico de hongos fitopatógenos. Arzanlou *et al.* (11) lograron estandarizar una técnica de diagnóstico molecular cuantitativo de *M. fijiensis*, *M. musicola* y *M. eumusae* para apoyar la vigilancia cuarentenaria de estas especies. Sin embargo, utilizaron oligonucleótidos específicos correspondiente al gen de la *α-tubulina*. A pesar de la sensibilidad de esta técnica, no todos los laboratorios pueden acceder a ella debido a su elevado costo.

El uso de herramientas moleculares en este estudio permitió confirmar que los aislados identificados previamente, mediante técnicas morfológicas, como *M. fijiensis* pertenecían en efecto a la especie citada, lo cual permitirá avanzar en estudios de caracterización bioquímica, fisiológica, patogénica y de agresividad del agente causal de la Sigatoka negra en Cuba.

REFERENCIAS

1. Stover RH, Simmonds NW. Bananas. Tropical Agriculture Series. Longman, Harlow, UK. 1987; 13-17.
2. Johanson A. Detection of banana leaf spot pathogens by PCR. Bulletin OEPP/OPPO. 1995;25:99-107.
3. Otero AJ, Sarracent J, Hernández H, Sánchez M, Muirragui D, Villamar M, et al. Monoclonal antibody-based TAS-ELISA for quantitative detection of *Mycosphaerella fijiensis* antigens. Journal of Phytopathology. 2007;155:713-719.

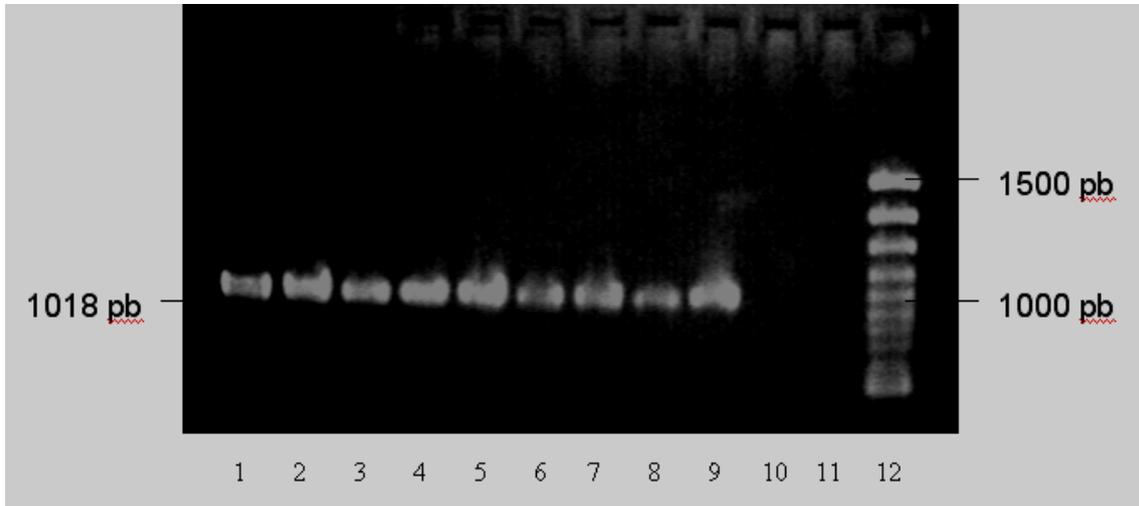


FIGURA. Productos de amplificación del ADN de los diferentes aislados de *M. fijiensis* obtenidos con la utilización de los oligonucleótidos MF137/R635. Líneas 1-9: aislados CCIBP-Pf34, CCIBP-Pf39, CCIBP-Pf54, CCIBP-Pf57, CCIBP-Pf64, CCIBP-Pf66, CCIBP-Pf80, CCIBP-Pf83, CCIBP-Pf110; Línea 10: ADN de *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt; línea 11: control de agua; línea 12: marcador de peso molecular (O'RangeRuler™ 100 pb, Fermentas). / *DNA amplification products of M. fijiensis* isolates, using oligonucleotides MF137/R635. Lanes 1-9: isolates CCIBP-Pf34, CCIBP-Pf39, CCIBP-Pf54, CCIBP-Pf57, CCIBP-Pf64, CCIBP-Pf66, CCIBP-Pf80, CCIBP-Pf83, CCIBP-Pf110; Lane 10: DNA of *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt; lane 11: water control; lane 12: molecular weight markers (O'RangeRuler™ 100 bp, Fermentas).

4. Henderson J, Pattermore JA, Porchun SC, Hayden HL, Van-Brunschot S, Grice RE, et al. Black Sigatoka disease: new technologies to strengthen eradication strategies in Australia. *Australasian Plant Pathology*. 2006;35:181-193.
5. Liu Z, Stewart EL, Szabo LJ. Phylogenetic relationships among *Cercospora* and allied genera on banana based on rDNA sequence comparisons. *Phytopathology*. 1991;81:1240.
6. Goodwin SB, Dunkley LD, Zismann VL. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology*. 2001;91:648-658.
7. Molina C, Aponte S, Gutiérrez A, Núñez V, Kahl G. Development and application of molecular markers in *Mycosphaerella* populations in Colombia. En: Jacome LP, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R, Escalant JV (eds). *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. 2003;131-139.
8. Rivas GG, Zapater MF, Abadie C, Carlier J. Founder effects and stochastic dispersal at the continental scale of the fungal pathogen of bananas *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*. 2004;13:471-482.

Recibido: 30-4-2012.

Aceptado: 8-11-2012.