

NOTA TÉCNICA

Caracterización molecular de aislados cubanos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en base a grupos de apareamiento sexual

Michel Leiva-Mora*, Orelvis Portal, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Mileidy Cruz-Martín, Cynthia Sánchez-García, L. Rojas, Berkis Roque, Karina Carrera

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

RESUMEN: Los hongos poseen grupos de apareamiento sexual que controlan la especificidad de su reproducción. En *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, existen dos grupos *MAT* 1-1-1 y *MAT* 1-2-1. El objetivo del presente trabajo, consistió en caracterizar molecularmente aislados cubanos de *M. fijiensis* a partir de la información disponible de las secuencias de sus ideomorfos. Se utilizaron nueve aislados de *M. fijiensis*, obtenidos a partir de hojas necrosadas de *Grande naine*, procedentes de plantaciones de cinco localidades de Cuba (Ciego de Ávila, Santa Clara, Santo Domingo, Remedios y Vueltas). Los oligonucleótidos (Mf*MAT*1-2-1 y Mf*MAT*1-1-1) fueron diseñados a partir de la información disponible de las secuencias de los ideomorfos correspondientes a los genes *MAT*1-1-1 y *MAT*1-2-1 de *M. fijiensis*. Se lograron amplificar fragmentos de ADN de 307 y 546 pares de bases mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), correspondientes con los grupos de apareamiento *MAT* 1-1 en cinco aislados (CCIBP-Pf34, CCIBP-Pf39, CCIBP-Pf57, CCIBP-Pf66, CCIBP-Pf80) y cuatro pertenecientes al *MAT* 1-2 (CCIBP-Pf54, CCIBP-Pf64, CCIBP-Pf110, CCIBP-Pf83). Se demostró molecularmente la presencia de ambos grupos de apareamiento sexual en aislados cubanos de *M. fijiensis* y se ratificó el carácter heterotálico de esta especie. Este resultado facilitará la obtención *in vitro* y en casa de cultivo del estado sexual de *M. fijiensis*, al disponer de aislados compatibles sexualmente.

Palabras clave: ascomicetes heterocarióticos, compatibilidad genética, grupos de apareamiento sexual, idiomorfos.

Molecular characterization of sexual mating type in Cubans *Mycosphaerella fijiensis* Morelet isolates

ABSTRACT: Fungi have sexual mating types that control the specificity of their reproduction. In *Mycosphaerella fijiensis*, the sexual reproduction is determined by two groups of sexual mating (*MAT*1-1-1 and *MAT* 1-2-1). The aim of this study was the molecular characterization of Cuban isolates of *M. fijiensis* from the available information of their idiomorph sequences. Nine isolates of *M. fijiensis* were obtained from necrosed leaves of *Grande naine* in five Cuban localities (Ciego de Ávila, Santa Clara, Santo Domingo, Remedios and Vueltas). The oligonucleotides Mf*MAT*1-1-1 and Mf*MAT*1-2-1 were designed from the information available of the sequences of the gene ideomorphs *MAT*1-1-1 and *MAT*1-2-1 of *M. fijiensis*. DNA fragments of 307 and 546 base pairs were amplified using the polymerase chain reaction technique (PCR). Five *M. fijiensis* isolates (CCIBP-Pf34, CCIBP-Pf39, Pf57-CCIBP, CCIBP-Pf66, CCIBP-Pf80) corresponded with the mating groups *MAT*1-1-1 and four isolates (CCIBP-Pf54, CCIBP-Pf64, CCIBP-Pf110, CCIBP-Pf83) matched with *MAT*1-2-1. Both sexual mating types were demonstrated to be present in the Cuban isolates of *M. fijiensis*, and the heterothallic character of this species was ratified. This result will also facilitate the easily obtaining of the sexual state of *M. fijiensis in vitro* and in the greenhouse in making use of sexually compatible isolates.

Key words: genetic compatibility, heterothallic ascomycetes, idiomorphs, sexual mating type.

*Autor para correspondencia. Michel Leiva-Mora. Correo electrónico: michel@ibp.co.cu

La reproducción sexual de los hongos comprende tres eventos fundamentales: la fusión de dos células haploides (plasmogamia) de modo que sus núcleos comparten el mismo citoplasma; luego la fusión nuclear (cariogamia) para formar una célula diploide; y finalmente la meiosis mediante la cual se producen núcleos haploides recombinantes.

Estos eventos pueden ocurrir en una estrecha sucesión, pueden estar separados en el tiempo o presentarse en diferentes estadios del ciclo de vida dependiendo de si el hongo es predominantemente haploide o diploide (1).

En relación con lo anterior, el apareamiento y la selección de la pareja, constituyen puntos críticos en los ciclos de vida de los organismos que se reproducen sexualmente (2). Según Billiard (3), en los hongos existen grupos de apareamiento sexual que responden a un mecanismo de regulación genética que controla la especificidad de apareamiento (genes de compatibilidad sexual).

Desde el punto de vista genético los grupos de apareamiento sexual están determinados por genotipos sexualmente compatibles. En términos de heterotalismo, los grupos de apareamiento se definen como auto-estériles, en los cuales se requiere el aporte de los núcleos de ambos progenitores. En las especies homotálicas o autofértiles la reproducción sexual involucra a núcleos genéticamente idénticos por lo que no existen grupos de apareamiento sexual. Además, existe el pseudohomotalismo que se refiere a un sistema en el que una misma cepa es autofértil pero los núcleos que participan en la fusión nuclear son genéticamente diferentes (4).

Los sistemas heterotálicos pueden tener un solo *locus* (compatibilidad bipolar, en cuyo caso los genes no son pares alélicos sino que usualmente son diferentes uno de otro y son denominados idiomorfos), dos *locus* (compatibilidad tetrapolar, que comprende múltiples idiomorfos en cada *locus*) o pueden ser multilocus, con combinaciones de varios alelos respecto a los grupos de apareamiento sexual. La mayoría de los ascomicetes heterotálicos conocidos, poseen un solo *locus* con un sistema de apareamiento que comprende dos alelos (1).

Mourichon *et al.* (5), lograron reproducir *in vitro* por vez primera el estado sexual de *M. fijiensis*. Asimismo, Etebú *et al.* (6) demostraron que el proceso de reproducción sexual entre aislados compatibles de *M. fijiensis* puede estimular la reproducción sexual en condiciones *in vitro* para producir cuerpos fructíferos y ascosporas.

En el caso de *M. fijiensis* el apareamiento sexual está condicionado por dos grupos de apareamiento (*MAT 1-1* y *MAT 1-2*) (7). Sin embargo, esto solo se utilizó para la caracterización de aislados mexicanos. Es por ello, que el objetivo del presente trabajo, consistió en caracterizar molecularmente aislados cubanos de *M. fijiensis* a partir de la información disponible sobre las secuencias de los ideoformos MfMAT1-1-1 y MfMAT1-2-1.

Para este estudio 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). Los aislados se obtuvieron a partir de hojas enfermas del cultivar *Grande naine* que mostraban manchas necróticas con centros grises y secos (8). Las hojas procedían de plantaciones de cinco localidades del país (Ciego de Ávila, Santa Clara, Santo Domingo, Remedios y Vueltas), donde no se habían realizado aplicaciones de fungicidas con excepción de la región de Ciego de Ávila.

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 Bio-Photometer, Alemania), utilizando la relación de Absorbancia 260/280 nm. Para chequear su integridad, se tomaron 2 µl del ADN y se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% con 1X TBE, y posteriormente se realizó la tinción con bromuro de etidio. Una vez confirmada su integridad se procedió a realizar los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los oligonucleótidos fueron diseñados mediante el programa Primer 3 (versión 4.0) (9), a partir de la información disponible de las secuencias de los ideomorfos de los genes *MAT1-1-1* (Número de acceso GenBank, DQ787015.1) y *MAT1-2-1* (Número de acceso GenBank, DQ787016.1) de *M. fijiensis*, correspondientes a los grupos de apareamiento sexual secuenciados por Conde-Ferrández *et al.* (10).

Para la amplificación por PCR, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Mfmat 1-1 Fwd 5'-AACGACAAGGACGAGACCAC-3', Mfmat1-1 Rev 5'-TGAAGCTGATGTCTGAACTGG-3' para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 307 pb; mientras que con los oligonucleótidos Mfmat1-2 Fwd 5'-AGAAGCGCATGACCAAGAAC-3' y Mfmat1-2 Rev 5'-TGAACGCATTGAAATCTGCT-3', se diseñaron para obtener un fragmento de aproximadamente 500pb.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un tampón constituido por: 50 mM KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris HCl pH 8,3 que contenían la mezcla de reacción 200 μ M de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Pharmacia, Inglaterra), 200 nM de los primer MAT 1-1 y MAT 1-2, así como una unidad de Taq ADN polimerasa (Boehringer Mannheim) y 0,5 μ l de ADN genómico (50 ng. μ l⁻¹) utilizado como molde. El volumen final de reacción fue de 50 μ l. La amplificación del ADN, se efectuó en un termociclador Mastercycler personal (Eppendorf, Alemania), programado de la siguiente forma: 94°C durante 2 min, luego 34 ciclos de: 94°C, 45 seg; 55°C, 45 seg; 72°C, 1 min; seguido de un ciclo de 72°C, 7 min.

Los productos amplificados correspondientes a MfMAT1-1-1 y MfMAT1-2-1, fueron corridos en un gel de agarosa al 0,8% con 1X TBE y posteriormente se realizó la tinción con bromuro de etidio. Las fotografías de los geles se tomaron con un densitómetro de imágenes modelo Gel Doc 2000 (Biorad, Italia).

Con la utilización de los oligonucleótidos diseñados en este estudio, se lograron amplificar mediante la técnica de PCR fragmentos de ADN de 307 y 546 pares de bases, correspondientes a los grupos de apareamiento MAT1-1-1 (CCIBP-Pf34, CCIBP-Pf39, CCIBP-Pf57, CCIBP-Pf66 y CCIBP-Pf80) y MAT1-2-1 (CCIBP-Pf54, CCIBP-Pf64, CCIBP-Pf110 y CCIBP-Pf83) (Figura).

Este resultado confirmó la presencia de ambos grupos de apareamiento sexual en los aislados cubanos de *M. fijiensis* obtenidos a partir de hojas infectadas naturalmente en diferentes localidades del país y ratificó el carácter heterotálico de este hongo. Disponer de aislados de *M. fijiensis* compatibles sexualmente, puede facilitar la realización de estudios genéticos en condiciones controladas, así como la evaluación del período de generación sexual para evaluar tempranamente la resistencia de genotipos de *Musa* frente al agente causal de la Sigatoka negra.

Los *locus* correspondientes a los diferentes grupos de apareamiento sexual en *M. fijiensis* fueron secuenciados parcialmente por Conde-Ferrández (10). Estos autores depositaron en el banco genético internacional (Genbank) las secuencias DQ787015.1 correspondientes al MAT 1-1-1 y DQ787016.1 para el MAT 1-2-1; sin embargo no diseñaron oligonucleótidos específicos para identificar mediante PCR dichos genes, lo que se abordó en el presente trabajo y permitirá incorporar un nuevo carácter en la diferenciación de aislados de *M. fijiensis*.

Se encontró similitud entre las secuencias de los grupos de apareamiento sexual de diferentes especies

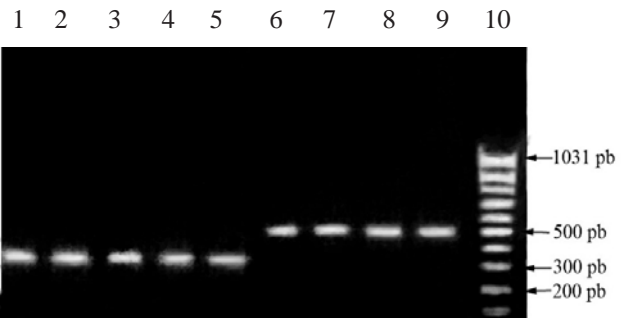


FIGURA. Productos de amplificación del ADN de los nueve aislados de *M. fijiensis*, acorde con las secuencias de las ideomorfo de los genes *mat 1-1* (Número de acceso GenBank, DQ787015.1) y *mat 1-2* (Número de acceso GenBank, DQ787016.1) de *M. fijiensis*. Líneas 1 - 9: CCIBP-Pf34, CCIBP-Pf39, CCIBP-Pf57, CCIBP-Pf66, CCIBP-Pf80, CCIBP-Pf54, CCIBP-Pf64, CCIBP-Pf110, CCIBP-Pf83; línea 10 marcador de peso molecular de ADN (*Mass ruler M. fijiensis low range*, Fermenta). / *DNA amplification products of nine M. fijiensis isolates, according with the gene ideomorph sequences MAT1-1-1 (GenBank access number, DQ787015.1) and MAT1-2-1 (GenBank access number, DQ787016.1) of M. fijiensis. Lanes 1 - 9: CCIBP-Pf34, CCIBP-Pf39, CCIBP-Pf57, CCIBP-Pf66, CCIBP-Pf80, CCIBP-Pf54, CCIBP-Pf64, CCIBP-Pf110, CCIBP-Pf83; Lane 10 DNA molecular weight marker (Mass ruler Mass ruler M. fijiensis low range, Fermenta).*

de hongos filamentosos tales como: *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter, *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr, *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge, *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg y *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch (11), lo cual puede ayudar a un mejor entendimiento de su localización, función, conservación y evolución de estos representantes de ascomicetes. En este sentido, en varios ascomicetes se han caracterizado en detalle las secuencias de los grupos de apareamiento sexual y la localización de otros genes en su vecindad (12, 13, 14).

En la mayoría de los hongos que se reproducen sexualmente, los genes correspondientes a los grupos de apareamiento sexual codifican proteínas y péptidos que pueden unirse al ADN y controlar la expresión de varios genes. Del mismo modo existen evidencias que indican la producción de feromonas específicas en ascomicetes filamentosos que pueden estar bajo el control de los genes de compatibilidad sexual. Por ejemplo, en *Neurospora crassa* las hifas masculinas producen un tipo de feromona que desencadena una respuesta de cambio de orientación en el crecimiento en su correspondiente hifa femenina especializada (tricógenos) (2).

En varias especies de ascomicetes heterotálicos, se han caracterizado las secuencias de los grupos de apareamiento sexual y la localización de otros genes en su vecindad (12, 13, 14), lo cual ha permitido un mejor entendimiento del ciclo de reproducción sexual, así como la determinación de las funciones biológicas de los productos codificados por dichos genes y los factores que influyen en su regulación. Por ejemplo, Metin *et al.* (15), determinaron los genes correspondientes a los grupos de apareamiento sexual de *Cryptococcus heveanensis* (Groen.) Baptist & Kurtzman así como su localización física a nivel cromosómico para evaluar la evolución de los determinantes del sexo en dicha especie.

En el caso particular de *M. fijiensis*, Conde-Ferraéz *et al.* (10) cuando estudiaron la estructura de los grupos de apareamiento sexual en *M. fijiensis*, consideraron que existía una elevada conservación en el locus correspondiente a dichos genes, lo cual puede estar justificado por la diferencia en las secuencias de los idiomorfos de los mismos, que evita el proceso de recombinación genética. Asimismo, Conde-Ferraéz *et al.* (7) desarrollaron un método molecular para identificar la frecuencia y distribución en los grupos de apareamiento sexual en aislados mexicanos de *M. ûjiensis* obtenidos a partir de conidios y ascosporas.

Por otra parte, Arzanlou *et al.* (16) lograron clonar y secuenciar los loci correspondientes a los grupos de apareamiento sexual de *M. musicola* R. Leach ex J.L. Mulder y *M. eumusae* Crous & Mour. Cuando confrontaron estas secuencias con las informadas para *M. fijiensis*, identificaron dos regiones génicas adicionales con una organización genómica única, las cuales contenían parte de las secuencias de los idiomorfos *MAT1-1-1* y *MAT1-2-1*, sugiriendo la existencia de un ancestro común en el cual ocurrieron eventos de fusión entre las secuencias de los *MAT1-1-1* y *MAT1-2-1*. Los resultados de estos autores sugieren una dinámica evolutiva y gran flexibilidad en los loci correspondientes a los *MAT* de las principales especies de *Mycosphaerella* causantes del manchado de las hojas de plátanos y bananos.

Disponer de aislados cubanos de *M. fijiensis* adecuadamente caracterizados, en base a los grupos de apareamiento sexual; permitirá evaluar la capacidad de reproducción sexual y la recombinación genética de este hongo fitopatógeno en condiciones controladas. Adicionalmente, esto propiciará un mejor entendimiento del ciclo de reproducción sexual y los aspectos que inciden en su regulación, la determinación de las posibles funciones biológicas de los productos codificados por los genes de los grupos de apareamiento

sexual; así como los mecanismos reguladores del dimorfismo sexual en *M. fijiensis*.

De igual manera, la creación de mutantes GFP (del inglés, *Green Fluorescent Protein*) mediante la transformación genética, sería una herramienta auxiliar para observar histológicamente la dinámica y evolución del proceso de reproducción sexual *in vitro* e *in vivo* mediante la inoculación artificial en un mismo genotipo de *Musa* con cepas de *M. fijiensis* que difieran en sus grupos de apareamiento sexual.

REFERENCIAS

1. Deacon JW. Diversity of fungi. Fungal biology. Blackwell publishing Ltd. Oxford, USA. 2006; 39-40.
2. Souza CAJ, Silva CC, Ferreira AVB. Sex in fungi: lessons of gene regulation. Genetics and Molecular Research. 2003;2(1):136-147.
3. Billiard Sylvain, Manuela López-Villavicencio, Benjamin Devier, Michael E. Hood, Cécile Fairhead, Tatiana Giraud. Having sex, yes, but with whom? Inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. Biological Reviews. 2011;86(2):421-442.
4. Lu Shun-Wen, Yun Sung-Hwan, Lee Theresa, Gillian Turgeon B. Altering sexual reproductive mode by interspecific exchange of *MAT* loci. Fungal Genetics and Biology. 2011;48(7):714-724.
5. Mourichon Xavier, Zapater MF. Obtention *in vitro* du stade *Mycosphaerella ûjiensis* forme parfaite de *Cercospora ûjiensis*. Fruits 1990;45:213-218.
6. Etebu Ebimieowei, Pasberg-Gauhl Cornelia, GauhlFriedhelm, Ayibo Lloyd Daniel-Kalio. Preliminary Studies of *in vitro* Stimulation of Sexual Mating among Isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, Causal Agent of Black Sigatoka Disease in Bananas and Plantains. Phytoparasitica. 2003;31(1):1-7.
7. Conde-Ferráz L, Grijalva-Arango R, Canto-Canché BB, Manzo-Sánchez G, Canul-Salazar MI, James AC. The development of mating type-specific primers for *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black Sigatoka of banana, and analysis of the frequency of idiomorph types in Mexican populations. Australasian Plant Pathology. 2010;39:217-225.

8. Fouré E. Les cercosporioses du bananier et leur traitement. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Moreletau Gabon. *Fruits*. 1985;40:393-399.
9. Rozen S, Helen JS. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. 2000;365-386.
10. Conde-Ferrández L, Waalwijk C, Canto-Canché BB, KEMA GHJ, Crous PW, Andrew CJ. Isolation and characterization of the mating type locus of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease of banana. *Molecular Plant Pathology*. 2007;8(1):111-120.
11. Waalwijk C, Van der Lee T, Vries I, Hesselink T, Arts J, Kema GHJ. Synteny in toxigenic *Fusarium* species: The fumonisin gene cluster and the mating type region as examples. *European Journal of plant Pathology*. 2004;110:533-544.
12. Butler G, Kenny C, Fagan A, Kurischko C, Gaillardin C, Wolfe KH. Evolution of the mat locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:1632-1637.
13. Debuchy R, Turgeon BG. Mating-type structure, evolution and function in *Eurotiomycetes*. En: *The Mycota I. Growth, differentiation and sexuality* (Kues, U and Fisher, R., eds), Berlin/Heidelberg: Springer Verlag. 2006;293-323.
14. Bayraktar H, Dólar FS, Maden S. Mating type Group of *Ascochyta blight* (Teleomorph: *Didymella blight*), the causal agent of Chickpea blight in Central Anatolia. *Turk J of Agric For*. 2007;31:41-46.
15. Metin B, Findley K, Heitman J. The Mating Type Locus (*MAT*) and Sexual Reproduction of *Cryptococcus heveanensis*: Insights into the Evolution of Sex and Sex-Determining Chromosomal Regions in Fungi. *PLoS Genet*. 2010;6(5): e1000961. doi:10.1371/journal.pgen.1000961
16. Arzanlou M, Crous PW, Zwiars LH. Evolutionary dynamics of mating-type loci of *Mycosphaerella* spp. occurring on banana. *Eukaryot Cell*. 2010;9:164-172.

Recibido: 26-9-2012.
Aceptado: 3-12-2012.