



**INSTITUTO
DOMINICANO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y
FORESTALES**



Identificación de hongos asociados a la podredumbre de la corona del fruto del banano orgánico por medio de la secuenciación de la región ITS del ADN ribosómico

G. Godoy-Lutz , T. Polanco, J. Arias y M. Halpay

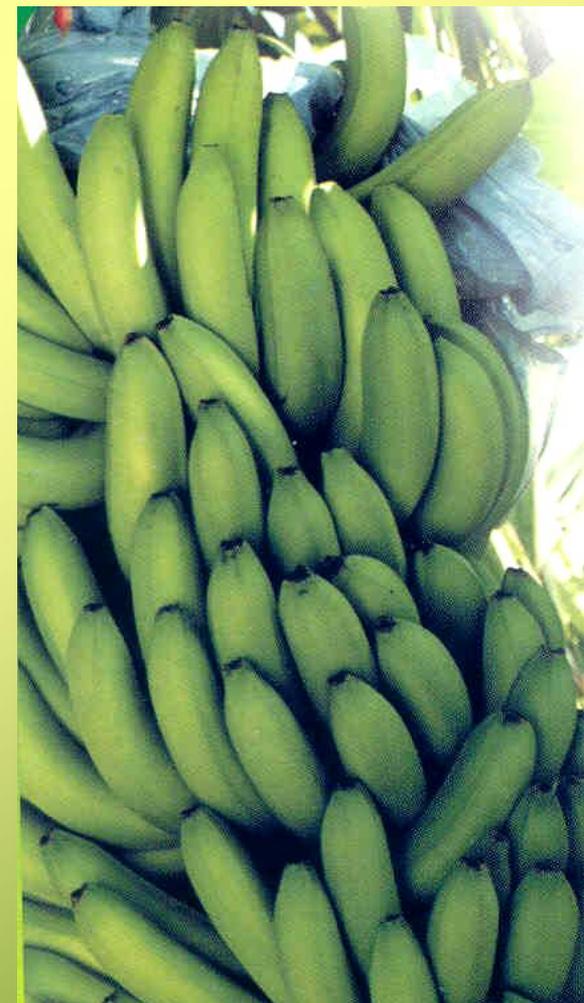
Programa de Protección Vegetal



Exportaciones de Banano (*Musa AAA*) en Republica Dominicana



- Principal exportador a la Comunidad Europea, Estados Unidos, Japón y Canadá
- 100,000 T. M anuales
- US \$65 millones exportaciones a Europa
- 30% de la producción de banano orgánico se origina en el Valle de Azua, R. D



Antecedentes



- 300 Productores de banano orgánico en el Valle de Azua (3 asociaciones)
- Embarques de banano dañados por la Podredumbre de la Corona (PC)
- Desde el 2003. Baja calidad y oferta (60% de la demanda)
- Penalización de US\$ 200,000
- Pérdida de mercado



Estándares del comercio justo para banano orgánico



Rechazo de cajas en puertos de desembarque

Podredumbre de la corona

Invasión del tejido por patógenos que afecta > 40% de la corona-racimo inaceptable.

Tolerancia de 1% de los racimos

Crecimiento de moho en la corona

Si > 40% de la corona esta cubierta de moho o micelio-racimo inaceptable.

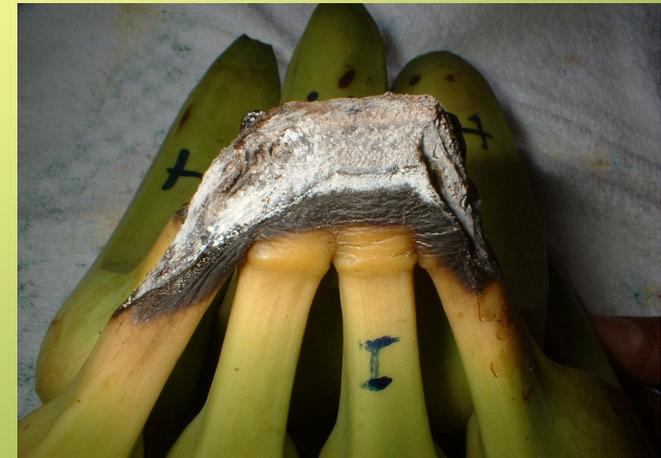
Tolerancia de 1% de los racimos

Podredumbre de la corona del fruto del banano



➤ Enfermedad post cosecha banano/plátano

- Podredumbre tejido cáscara y pulpa
- Complejo de hongos
 - *Colletotrichum musae*
 - *Botryodiplodia theobromae*
 - *Fusarium roseum*
 - *Verticillium theobromae*
 - Asociados (simultáneos o sucesivos)
 - Hongos + bacterias





... Podredumbre de la corona del fruto del banano

- **Diferentes microorganismos pueden predominar de acuerdo a la localidad, periodo de año, otros**
- **Bajo los esquemas de la agricultura orgánica solo se utilizan fungicidas naturales (ácidos orgánicos, aceites, agentes biológicos) para prevenir o controlar la PC**



Antecedentes de investigación. Lavaderos de banano orgánico, Azua. R. D.



- Muestreos de agua de tinajas de lavado en Azua en el 2003-2004
- Se aislaron hongos en el agua del lavado de frutos tratada con ácidos orgánicos
- La mayoría de aislados de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium*



... Antecedentes de investigación



- Aislamientos de *Fusarium* y *Colletotrichum* causaron PC bajo condiciones experimentales
- Aceleraron la madurez en racimos inoculados
- Aislamientos resistentes a los tratamientos con ácidos



T. Polanco et al., 2004. 40va. Reunion Caribbean Food Crops Society

Importancia de la identificación de las especies de patógenos



- Cumplir criterios de diagnóstico del problema. Aislar e identificar correctamente la especie del patógeno (Requisitos para comercio Fair Trade y Euregap)
- Aplicar las medidas fitosanitarias y tratamientos de acuerdo a la especie del patógeno. Susceptibilidad a las diferentes toxinas depende de la especie o cepa (*Colletotrichum*)
- Especies de los géneros *Colletotrichum* y *Fusarium* pueden ser patógenos de humanos



Objetivos

- Identificar las especies de los aislamientos causantes de la PC del banano por medio de secuenciar la región ITS de ADN ribosómico
- Comparar y determinar su relación con otras especies de hongos asociadas al banano reportadas en el NCBI GenBank



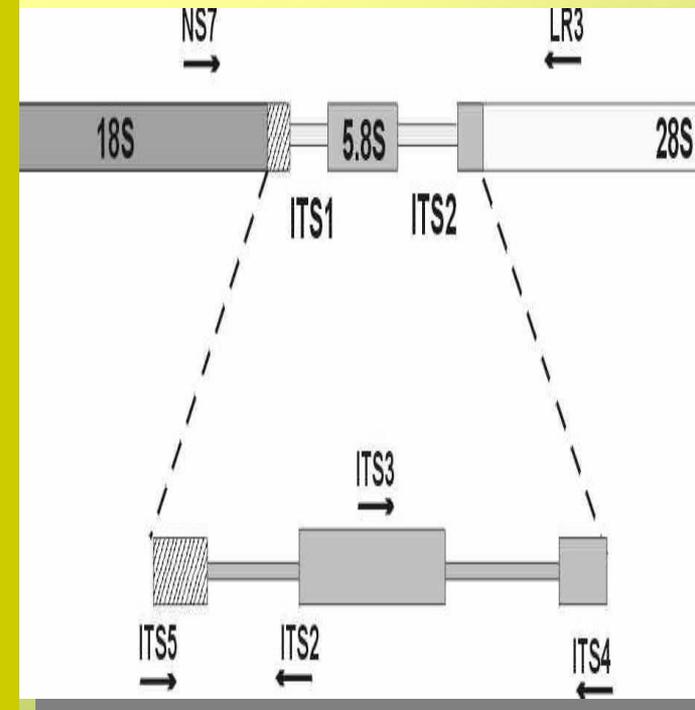
Materiales y Métodos



... Materiales y métodos

Herramienta molecular

- Región del ITS-5.8S rADN de 500-800 pb
- Copias múltiples → amplifica ADN ↑
- Caracterizar relaciones filogenéticas a diferentes niveles de la jerarquía taxonómica
- Apropriada para distinguir entre especies y variantes o razas
- Desarrollar marcadores específicos
- Disponibilidad de protocolos
- Secuencias publicadas en el NCBI GenBank de acceso público





...Materiales y métodos

- Cultivos monospóricos de 12 aislamientos transferidos a medio V8 líquido
- Extracción de ADN de micelio liofilizado y pulverizado con UltraClean Microbial DNA Isolation kit (Mobio, Laboratories, Inc.)
- Amplificación de muestras de 10 ng por PCR con cebadores:
 - **ITS 4** 5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3',
 - **ITS 5** 5'GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G3'



... **Materiales y métodos**

- Purificación del amplicón y secuenciación directa del amplicón en dos direcciones 5'→3' y 3'→5' en el DNA Sequencing Laboratory of the University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, USA
- Secuencias editadas con programa Bioedit Sequence Alignment Editor, versión 4.8.6 para seleccionar las región correspondiente a la región ITS del ADN ribosómico

... Materiales y métodos

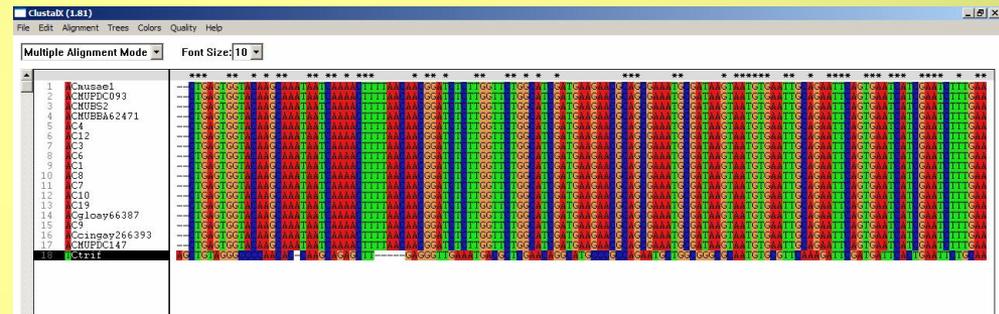
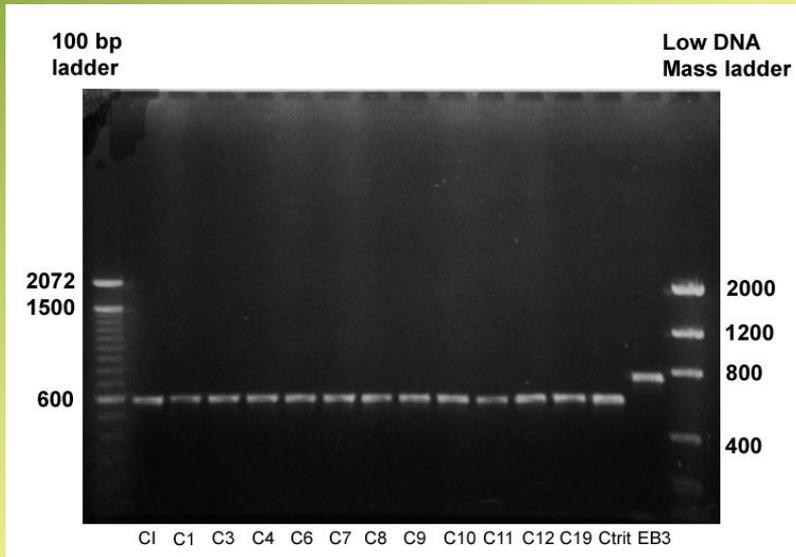


- Secuencias sometidas a un análisis con MEGABLAST (MEGA Basic Local Alignment Search Tool), nucleótido-nucleótido (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para determinar la homología de estas secuencias con otras de la base de datos de hongos en el NCBI GenBank
- Análisis de alineación múltiple de secuencias de los asilamientos de este estudio con otras de hongos asociados al banano publicados en el GenBank con el paquete Clustal W
- Construcción del árbol filogenético con valores bootstrap (GeneBee, algoritmo cluster)

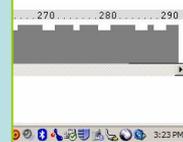
Resultados



Amplificación por PCR, secuenciación y alineación de secuencias múltiples



C1 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C3 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C4 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C6 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C7 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C8 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C9 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C10 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C12 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA
 C19 TGAGTTTA-CGCTCTACAACCCTTTGTGAACATACCTATAACTGTTGCTT-CGGCGGGTA



Análisis por MEGABLAST

Secuencias con alineaciones significativas con los aislamientos de *Colletotrichum* del banano



Número de accesión NCBI GenBank	Especies	Cepa	Substrato	Origen	Score (bits)	e
AY266378.1	<i>Glomerella cingulata</i> (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	CMUBE 1814	Plantas herbáceas	Thailandia	1044	0.0
AF272779.1	"	APL7	Manzano	E.U.A	1044	0.0
AY791887.1	"	TXMG001	Mango	China	1021	0.0
AY791886.1	"	TXMG002	"	"	1021	0.0
AY266393.1	"	G102	Plantas herbáceas	Thailandia	1021	0.0

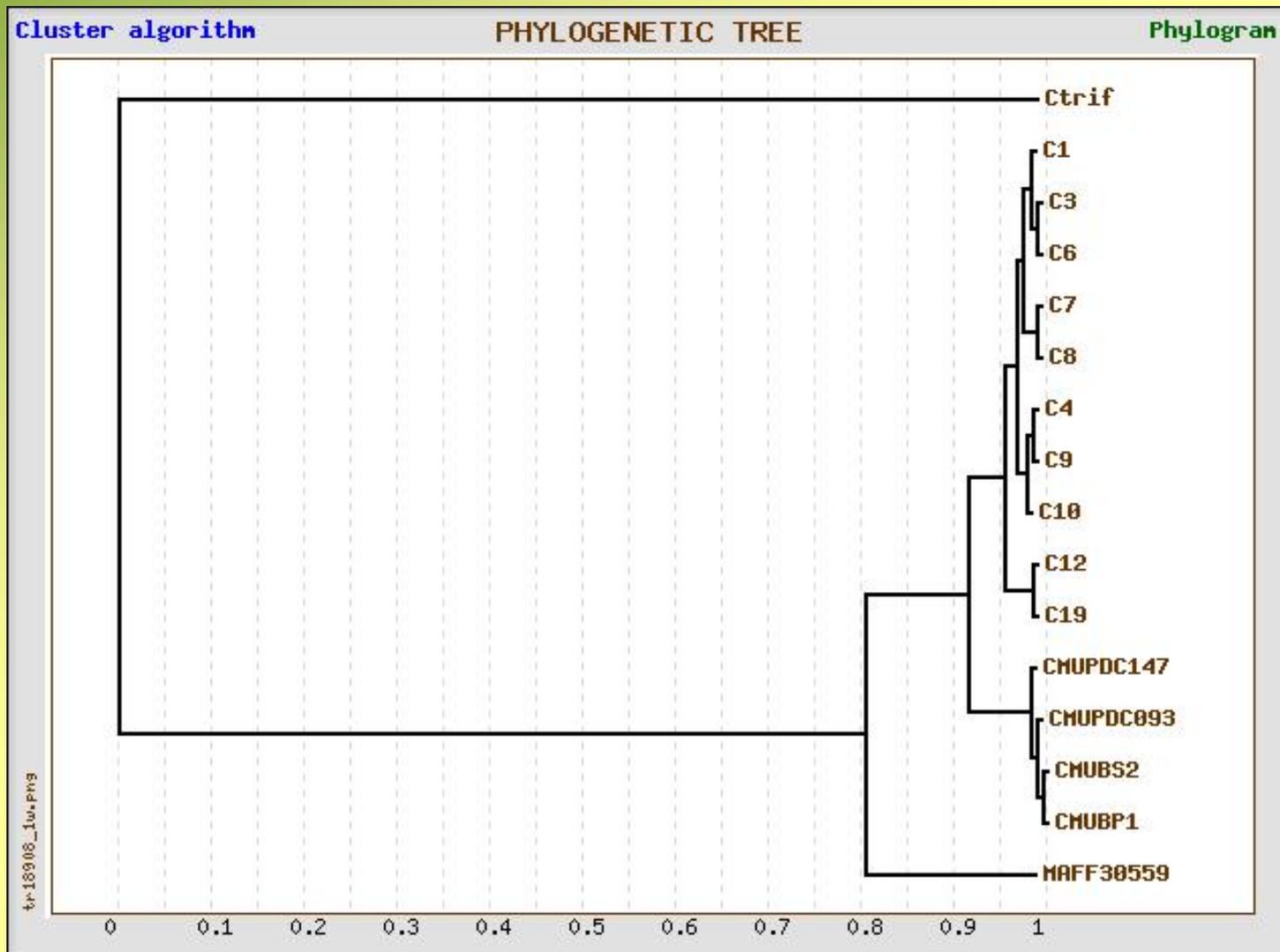
Análisis por MEGABLAST

Secuencias con alineaciones significativas con los aislamientos de *Fusarium* del banano



Numero de accesión NCBI GenBank	Especies	Cepa	Substrato	Origen	Score (bits)	e
DQ 026012	<i>Fusarium solani</i> (<i>Nectria haematococca</i>)	AHS- 253-10	<i>Amaranthus</i> <i>hyondriacus</i>	México	1008	0.0
DQ 026009	<i>F.lateritium</i> <i>N.haematococca</i>	AHS- 509-30	"	"	992	0.0
AY 745988	<i>N.haematococca</i>	CM4	Cacao	Brazil	983	0.0
AF130142	<i>N. haematococca</i>	MAFF 840047	?	Korea	977	0.0

Árbol filogenético



Resumen de resultados



- Los resultados indican que los todos los aislamientos identificados en el género *Colletotrichum* y *Fusarium* mostraron una similitud de 100% en la región ITS rADN, con *Glomerella cingulata* (anamorfo: *C. gloeosporioides*) y *Nectria haematococca* (anamorfo: *F. solani*) respectivamente.
- Las dos especies reportadas en el NCBI GenBank proceden de una diversidad de sustratos y hospederos no relacionados con Musáceas.



Conclusiones



- En base a la secuencia de la región ITS-5.8 S rADN de los hongos aislados del agua de lavado del fruto del banano orgánico en Azua son especies de hongos de diferentes taxa y no una sola especie, *C. musae*, como se ha reportado anteriormente.
- Las especies *Glomerella cingulata* y *Nectria haematococca* son cosmopolitas y plurivoras por lo que su presencia en el agua de lavado puede ser una consecuencia de prácticas sanitarias deficientes durante el lavado y procesamiento del fruto para el empaque.



Recomendaciones

- Eficientizar la sanidad de las instalaciones para lavado y empaque
- Remover hojas o inflorescencia previo al transporte al área de lavado
- Cosechar las frutas en el estado correcto de maduración (muy tempranas > susceptibilidad)
- Evitar el transporte de rastrojos de cosecha, hojas de banano u otros cultivos, otros residuos orgánicos del campo a las área de lavado y empaque



Recomendaciones



- Minimizar daños durante el corte del pedúnculo y/o y magulladuras a los racimos
- Se deben continuar los muestreos en diferentes áreas o zonas de producción de banano para determinar si la podredumbre es inducida por estas mismas especies u otras especies de hongos.
- Evaluar otros productos orgánicos, agentes biológicos a diferentes formulaciones y dosis para prevenir el desarrollo y crecimiento de los hongos causantes de la PC durante el transporte.



Agradecimientos



- Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales –CONIAF–
- Asociaciones de productores del Comercio Justo
- CIRAD/Guadalupe
- Universidad de Nebraska, Lincoln, Nebraska





Muchas Gracias