

Diagnóstico y caracterización molecular de *Mycosphaerella fijiensis* mediante la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos (RAPD) y análisis de regiones transcriptos internos (ITS´s)

¹Chacín Zambrano Christian Andrei | ²Ángel Díaz Jorge Evelio

Recibido:
Noviembre 20 de
2009

Aceptado:
Octubre 12 de
2010

Resumen

A partir de la lámina foliar se obtuvieron 12 aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* provenientes de zonas plataneras y bananeras de Colombia, estableciendo cultivos monospóricos para purificar y evitar solapamientos del hongo. Se extrajo el ADN a partir del micelio y tejido foliar infectado mediante el protocolo de Goodwin & Lee y Gilbertson & Dellaporta, obteniendo un ADN de buena calidad. Se amplificó la región ITS mediante iniciadores universales y específicos mostrando productos de amplificación de 233 pb para ITS A (iniciador 1 + iniciador 2), una banda de 360 pb para el ITS B (iniciador 3 + iniciador 4), una banda de 593 pb para el ITS C (iniciador 1 + iniciador 4) y un amplificado de 1080 pb con la combinación del iniciador específico MF 137 y R635. A la vez, se determinó la variabilidad genética por la técnica de RAPD´s generando productos de amplificación entre 280 pb – 2115 pb y bandas comunes entre los aislamientos obtenidos. Se determinó una similaridad genética de los aislamientos de Norte de Santander y el aislamiento de Mérida en un 70% con respecto a los de Santander, Antioquía con un 48% y 35% respectivamente.

Palabras clave: ITS´s, *Mycosphaerella fijiensis*, RAPD, *Sigatoka negra*, cultivos monospóricos.

Abstract

Coming from the foliar sheet it was possible to obtain 12 *Mycosphaerella fijiensis* isolations originating from the plantain and banana zones of Colombia, establishing monosporic cultures to purify and to avoid overlapping of the fungus. The DNA was extracted from the mycelium and the foliar tissue infected by means of the protocol of Goodwin and Lee and Gilbertson and Dellaporta, by good quality was obtained. The ITS region was amplified through of universal and specific primers showing products of amplification of 233 pb for the ITS A (primer 1 + primer 2), a 360 pb band for the ITS B (primer 3 + primer 4), a 593 pb band for the ITS C (primer 1 + primer 4) and an amplification of 1080 pb with the combination of the specific MF 137 y R635 primers. Simultaneously the genetic variability by the RAPD technique was determined

¹Ingeniero de Producción Biotecnológica, Magíster en Biotecnología de los Microorganismos ULA- Mérida, Docente – Investigador Universidad Francisco de Paula Santander - Colombia. christianchacin@gmail.com

²B. Sc, MSc., PhD. Coordinador del Laboratorio Nacional de Análisis Molecular ICA – Tibaitatá. jorgecol@gmail.com

generating products of amplification between 280 pb – 2115 pb and common bands between the obtained isolations. A genetic similarity was determined of the isolations of “Norte de Santander” in Colombia, and the isolation of “Mérida” in Venezuela, at 70% in relation with those of “Santander” and “Antioquia” in Colombia with 48% and 35% each determined respectively.

Keywords: ITS 's, *Mycosphaerella fijiensis*, RAPD, Black Sigatoka, monosporic cultures.

Introducción

Al romperse los equilibrios naturales entre las plantas y sus enemigos, éstos han proliferado en forma alarmante, causando alteraciones en la fisiología y morfología de las plantas, obligando al hombre a tener una lucha continua contra estos organismos vivos. Estas alteraciones pueden ser ocasionadas por bacterias, virus, nemátodos y principalmente por los hongos. Los hongos engloban una amplia variedad de formas reproductivas y de hábitos de vida (Agrios, 1996).

Aproximadamente existen 100.000 especies de hongos, que hasta el momento han sido descritas, los cuales, el hombre se ha preocupado por estudiar cerca de 8000 que son patogénicas a las plantas, y 100 que afectan al hombre (ICA Informa 25). Entre los hongos patogénicos que atacan las plantas, se encuentran una especie que afecta las plantaciones de plátano y banano. La sigatoka Negra causada por *Mycosphaerella fijiensis*, se han diseminado incontrolablemente en las regiones productoras del plátano y banano, donde son considerados como uno de los productos básicos de la dieta alimenticia de los países en desarrollo, este fruto, junto con las raíces y tubérculos, aportan el 40% del total de la oferta de alimentos en términos de calorías (UniValle – UPEC 2001), siendo una fuente de ingresos importantes para las familias campesinas y de nuestro país.

El presente trabajo muestra como el diagnóstico molecular, mediante técnicas

basadas en PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), los ITS 's universales, ITS 's específicos y RAPDs (Fragmentos polimórficos de DNA amplificado al Azar), son una herramienta útil para establecer una prueba estándar para la identificación de aislamientos y comparar la variabilidad genética del hongo causante de la Sigatoka Negra.

Materiales y métodos

Obtención del material vegetal. Las muestras con material infectado con Sigatoka negra se obtuvieron a partir de las recolecciones provenientes de zonas platanera y bananeras, donde se presentan los focos de la enfermedad. Las muestras a trabajar se envolvieron en papel periódico, teniendo en cuenta la identificación de cada una de ellas y guardadas a temperatura ambiente antes de enviarlas al Laboratorio de Análisis Molecular ICA – Tibaitatá.

Aislamiento del patógeno. Partiendo del material vegetal en su estado 5 – 6 de infección, se procede a recortar varias lesiones sucesivas hasta completar el área de una caja de petri pequeña. Luego de ello se establece un ambiente óptimo para la descarga de las ascosporas en un tiempo estimado de 30 minutos para evitar contaminación con otros agentes. Las cajas de petri son inspeccionadas haciendo un barrido microscópico utilizando el objetivo 40X (Stover, 1962).

Posteriormente a su identificación y señalamiento, se procedió a cortar con una aguja de disección, de forma delicada el

área de agar circundante a cada ascospora (Stover 1968). Se tomó cada fragmento de aproximadamente 2 mm² con el fin de traspasar dichos cortes a una caja de medio de cultivo mycophil agar o V8 sólido (Ruiz, 1997).

Establecimiento de cultivos monospóricos.

Una vez determinadas las características macroscópicas y microscópicas de cada uno de los aislamientos, se procedió a purificarlos, por medio de nuevo pases en PDA. Obtenida una única colonia o un número en el cual no existiera riesgo de superposición en cada caja de petri, se procedió a realizar cultivos monospóricos que permitió garantizar la pureza del hongo. Para esto, se tomó como referencia la metodología propuesta por Lopez (2004).

Extracción de ADN

Para el cumplimiento de este objetivo, se planteó estandarizar metodologías de extracción de ADN a partir del micelio del hongo para construir un banco de germoplasma de este agente, y a partir del material vegetal para facilitar el diagnóstico del agente causal de la Sigatoka negra en sus diferentes estadios de la enfermedad. Para ello, se empleó el siguiente procedimiento:

Extracción a partir del micelio del hongo.

Para la extracción de ADN total para *Mycosphaerella fijiensis*, se emplearon dos protocolos para obtener ADN de buena calidad: el protocolo de Goodwin and Lee en 1993 y Doyle and Doyle (1987) (Reportado Lopez, 2004).

Extracción a partir del material vegetal infectado.

Para la estandarización del protocolo de extracción de ADN a partir del material vegetal infectado, se probaron dos metodologías reportadas en otras investigaciones para la extracción de ADN vegetal como son: El protocolo de Stewart, 1993 y el protocolo de Gilbertson and Dellaporta.

Ampliación de la región ITS mediante iniciadores universales. Para el método de

diagnóstico al nivel de ITS's universales, se estandarizó el procedimiento de identificación para la amplificación de las regiones del rADN. (Tabla N° 1).

Tabla 1. Secuencia de iniciadores universales

PRIMER	SECUENCIA
ITS 1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS 2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'
ITS 3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

La reacción de PCR fue llevada a cabo en tubos de 1,5 mL de capacidad con un volumen final de 25 µL que contenía: 1 µL de DNA (60ng/µL), 16,35 µL de H₂O dd, 3 µL de MgCl₂ (6mM), 2.5 µL de Buffer (1X), 0.625 µL de Primer A (0.25 mM), 0.625 µL de Primer B (0.25 mM), 0.5 µL de Taq pol, 0.4 µL de DNTP's (0.2 mM). La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: : 94 °C por 2 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de 1 minutos por 94 °C, 57 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto y una elongación final de 72 °C por 10 minutos. Los amplificadores fueron analizados por electroforesis en gel de azarosa al 0,8% y se tiñó con Bromuro de etidio (0,5 ug/mL).

Amplificación de la región ITS mediante iniciadores específicos.

El diagnóstico molecular específico para *Mycosphaerella fijiensis* mediante el ADN extraído a partir del micelio del hongo y del material vegetal infectado, se basó en la amplificación mediante PCR utilizando tres combinaciones posibles de iniciadores con sus condiciones de amplificación. (Tabla N° 2).

Tabla 2. Secuencia de iniciadores específicos.

Primer	Secuencia 5' - 3'
R635	GGTCCGTGTTTCAAGACGG
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
MF 137	GGCGCCCCGGAGGTCTCCTT

Diagnóstico y caracterización molecular de *Mycosphaerella fijiensis* mediante la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos (RAPD) y análisis de regiones transcritos internos (ITS´s)

La reacción de PCR fue llevada a cabo en tubos de 1,5 mL de capacidad con un volumen final de 25 µL que contenía: 2,5 uL Buffer (1X), 1,5 µL de MgCl₂ (6 mM), 2,5 µL de DNTP`s (0.2 mM), 3 µL / Cada primer (0.2 mM), 0,5 µL de Taq pol, 5 µL de ADN (60 ng/mL), 6.85 µL de H₂O dd. La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 94 °C por 5 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minutos a 65 °C y 2 minutos a 72 °C y una elongación final de 72 °C por 5 minutos. Los amplificados fueron analizados por electorforesis en gel de agarosa al 0,8% y se tiñó con Bromuro de etidio (0,5 ug/ml).

Determinación de la variabilidad genética mediante el uso de la técnica RAPD. Para el método de RAPD`s se probaron 25 primers para la amplificación de la muestra, con las siguientes condiciones: La reacción se realizó en tubos eppendorf de 1,5 mL con un volumen final de 25 µL que contenía: 5 µL de Buffer (1X), 1 µL (0.2 mM) de dNTP`s, 1,5 µL de MgCl₂ (6mM), 0,25 µL de Taq pol, 37,25 µL de H₂O dd, 4 µL por decanucleótido (0.2mM) y 1 µL de DNA (60 ng/µL). La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 94 °C por 5 minutos, 44 ciclos de 6 minutos a 94 °C, 1 minutos a 36°C, 2 minutos a 72 °C y una elongación final de 72 °C por 10 minutos. Los amplificados fueron analizados por electorforesis en gel de agarosa al 0,8% y se tiñó con Bromuro de etidio (0,5 ug/mL).

Resultados y discusión

Obtención del material vegetal. Las muestras del material vegetal infectado por Sigatoka negra fueron obtenidas a partir de las recolecciones realizadas en los departamentos de Norte de Santander, Antioquia y Santander (Tabla N°3). Las muestras a trabajar deben encontrarse en los últimos estadios de la enfermedad (estadio 4, 5 y 6), donde se observa la presencia de los Peritecios, los cuales condicionan la formación de las

ascosporas, importantes para el aislamiento de *Mycosphaerella fijiensis*.

Tabla 3. Aislamientos obtenidos a partir de las muestras recolectadas.

N° Identificación	Departamento	Municipio	Finca
Sigt 1	Norte de Santander	Cúcuta	Granja ICA
Sigt 2	Norte de Santander	Cúcuta	Granja ICA
Sigt 3	Norte de Santander	Bochalema	Tolosa
Sigt 4	Norte de Santander	Bochalema	Tolosa
Sigt 5	Norte de Santander	Bochalema	Gutiérrez
Sigt 6	Norte de Santander	Chinácota	Los álamos
Sigt 7	Norte de Santander	El Diamante	Palermo
Sigt 8	Norte de Santander	Los Patios	Bochalemita
Sigt 9	Antioquia	Tarazá	Remolinos
Sigt 10	Antioquia	Támesis	Nacional
Sigt 11	Santander	Puerto Wilches	Atardecer
Sigt 12	Santander	Barraza	Renacer
Sigt 13	Mérida	Mérida	El Lago

Aislamiento del patógeno. Para el aislamiento del hongo, se trabajó con el método empleado y reportado por Stover en 1978, el cual establece un ambiente óptimo para las descargas de las ascosporas provenientes del material vegetal infectado. Durante el proceso de aislamiento del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, se establecieron condiciones exigentes a nivel de laboratorio, que permitieran el crecimiento y desarrollo del micelio, previniendo la contaminación de este por otros agentes (Figura N° 1). Las acciones preventivas que se emplearon para esta primera parte de la metodología fueron el pretratamiento del tejido vegetal infectado, mediante lavados con agua estéril e hipoclorito de Sodio al 1,2% con un tiempo de exposición de 1 minutos por cada lavado establecido.

Establecimiento de cultivos monospóricos. Para establecer los cultivos monospóricos de *Mycosphaerella fijiensis*, se empleó la metodología propuesta por Lopez (2004).

Para ello, se tomó una pequeña porción de los aislamientos con un asa estéril, transfiriendo la muestra a tubos de vidrio con un 1 mL de agua destilada previamente esterilizado y homogenizando con la ayuda de un vortex. Con ello se calculó la concentración de esporas/mL

mediante la cámara de Neubauer, dando una concentración promedio de 4×10^5 esporas/mL. Seguidamente, se realizaron los cálculos para obtener una solución con un volumen final de 1 mL, y una concentración final de 1 espora/mL, mediante la fórmula $C1 \times V1 = C2 \times V2$, Por Consiguiente, se tomó 10 uL de la solución inicial y se pasó a un tubo con 1 mL de agua destilada estéril y se homogenizó con vórtex, visualizando mediante microscopía el micelio del patógeno. (Figura N° 2).

Figura 1. *Mycosphaerella fijiensis*.

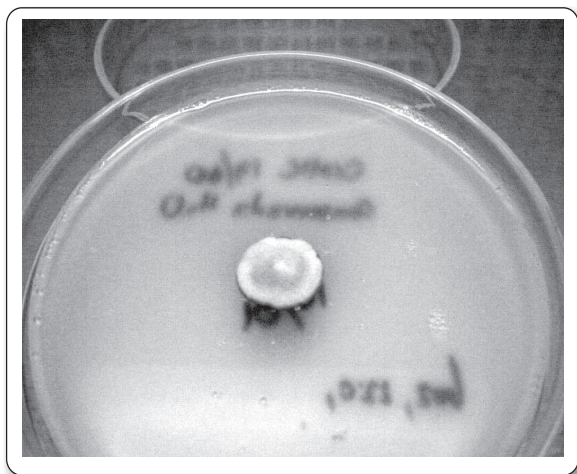
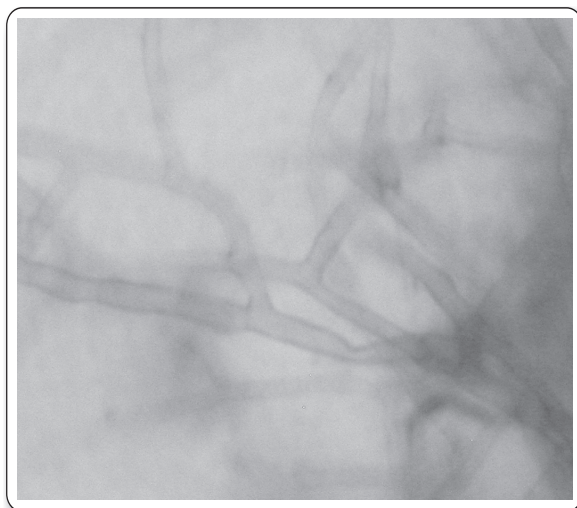


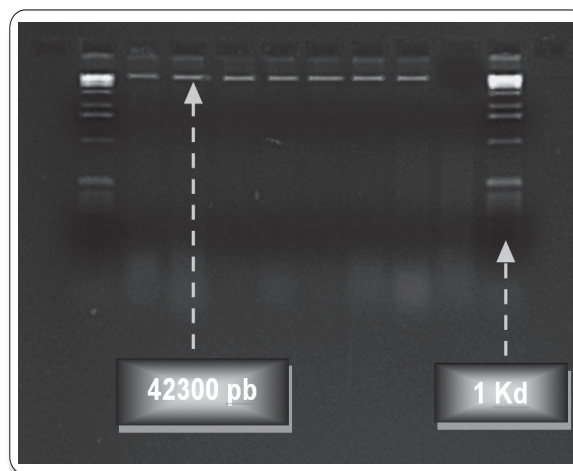
Figura 2. Microscopía del micelio *M. fijiensis*.



gel de agarosa del ADN total, se obtuvieron bandas de excelente calidad, sin degradación, ni presencia de RNAsas, lo cual confirma los buenos resultados con el protocolo de Sarmiento, I & Angel, J. 2004.

Se observó una banda monomórfica en la electroforesis en gel de agarosa del ADN total extraído mostrando un peso de 42300 pb a partir del micelio de cada uno de los aislamientos obtenidos, como se observa en la figura N° 3.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de ADN total de *Mycosphaerella fijiensis* extraídos por el método de GOODWIN AND LEE en 1993, correspondiente a los aislamientos.



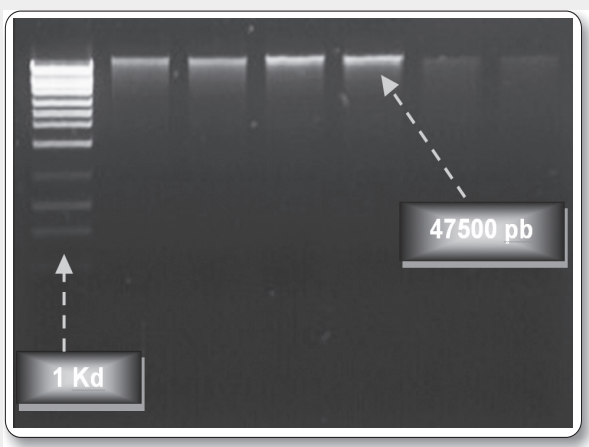
Extracción de ADN a partir del material vegetal infectado. Con respecto a la electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído del tejido vegetal infectado, se obtuvieron bandas de excelente calidad, sin degradación, ni presencia de RNAsas, lo cual convierte al protocolo de Gilbertson and Dellaporta (Lopez, J, 2004) como una buena opción para la extracción de ADN a partir de material vegetal. Se observó una banda monomórfica en la electroforesis en gel de agarosa del ADN total extraído a partir de tejido vegetal infectado. Se estableció mediante el uso del marcador de peso molecular de 1 kd ladder, el tamaño de las bandas obtenidas en la electroforesis, mostrando un peso de 47500 pb en cada una de ellas. (Figura N° 4).

Extracción del DNA

Extracción de ADN a partir del micelio del hongo. Con respecto a la electroforesis en

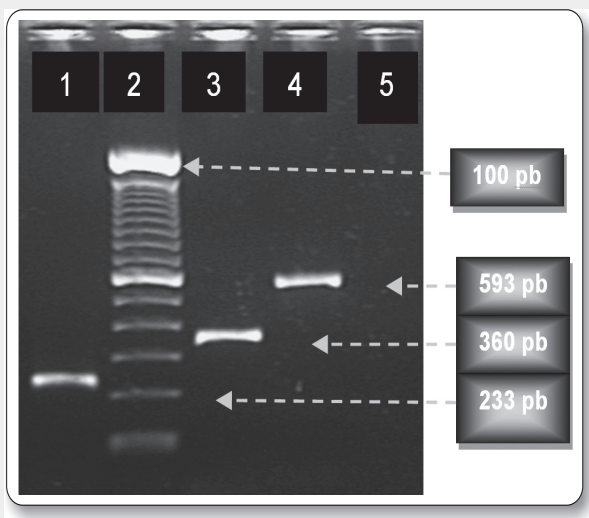
Diagnóstico y caracterización molecular de *Mycosphaerella fijiensis* mediante la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos (RAPD) y análisis de regiones transcritos internos (ITS's)

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del ADN total extraído por el método de Gilbertson and Dellaporta modificado por el Lopez, 2004 a partir del tejido vegetal infectado.



Amplificación de la región ITS mediante iniciadores universales

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación con iniciadores universales a partir de ADN de *Mycosphaerella fijiensis*. Los carriles corresponden a las siguientes amplificadas: Carril 1: ITS A, Carril 2: Marcador de peso molecular de 100 pb, Carril 3: ITS B, Carril 4: ITS completo, Carril 5: Control negativo.



En la prueba diagnóstica por PCR utilizando los iniciadores universales **ITS 1 e ITS 2**, se obtuvo un factor de amplificación de **233,0 pb**, denominando esta región **ITS A** (carril 1); ya que corresponde a la región amplificada entre el final de la subunidad 18S y el inicio de la secuencia del gen 5,8S.

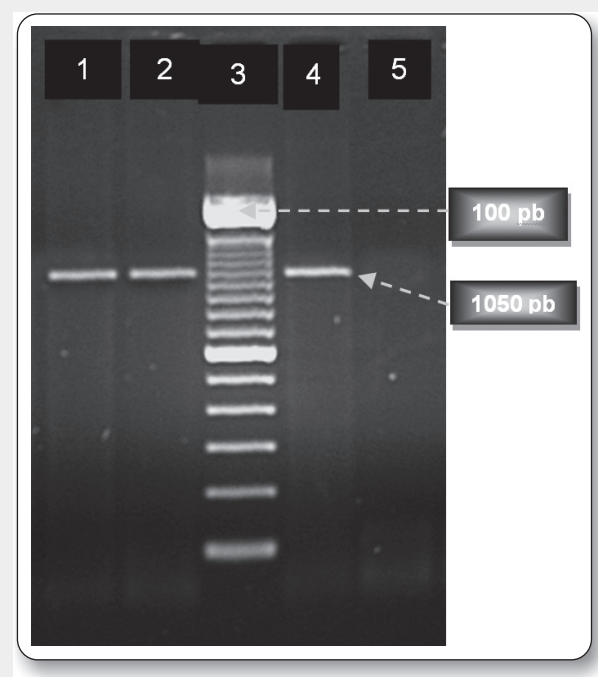
En la prueba de PCR utilizando los iniciadores universales **ITS 3 e ITS 4**, se obtuvo un factor de amplificación de **360,0 pb**, denominando esta región **ITS B** (carril 3); ya que corresponde a la región amplificada entre el final de la subunidad 5,8S y el inicio de la secuencia del gen 28S.

Igualmente, para la prueba de PCR utilizando los iniciadores universales **ITS 1 e ITS 4**, se obtuvo un producto amplificado de **593,0 pb**, denominando esta región **ITS completo** (carril 4); ya que corresponde a la región amplificada entre el final de la subunidad 18S y el inicio de la región 28S. (Figura N° 5).

Amplificación de la región ITS mediante iniciadores específicos.

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de productos amplificados mediante oligonucleótidos específicos a partir de ADN extraído del micelio del hongo. Los carriles corresponden a los siguientes amplificados:

- Carril 1: Aislamiento Norte de Santander (Bochalema);
- Carril 2: Aislamiento Santander (Puerto Wilches);
- Carril 3: Marcador de peso molecular 100 pb;
- Carril 4: Aislamiento Mérida (Control positivo);
- Carril 5: Control negativo.

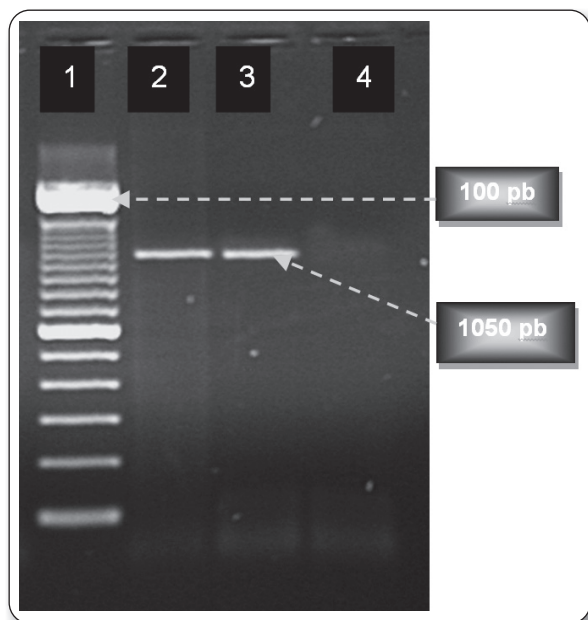


Los productos amplificados obtenidos en la prueba de PCR utilizando los iniciadores

específicos MF 137 y R635 generó un fragmento con un peso molecular de 1050 pb, lo cual concuerda con las pruebas realizadas por Charry, C. 2002, quien practicó el diagnóstico molecular a *Mycosphaerella fijiensis*, obteniendo los pesos específicos de la banda entre 1000 pb a 1080 pb, utilizando los iniciadores MF 137 y R635; y una banda de 500 a 580 pb, usando los iniciadores MF 137 e ITS 4. (Figura N° 6).

Figura 7. Amplificación con iniciadores específicos a partir de ADN extraído del material vegetal infectado. Los carriles corresponden a los siguientes amplificados:

- Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb;
- Carril 2: Material vegetal de Norte de Santander (Chinácota);
- Carril 3: Aislamiento Mérida (Control positivo);
- Carril 4: Control negativo.



Se comprobó la sensibilidad y la especificidad de los iniciadores MF 137 y R635 utilizados para el diagnóstico de *Mycosphaerella fijiensis* en el ADN extraído a partir de tejido vegetal infectado, ya que, la muestra de ADN usada para la amplificación contenía ADN total, en otras palabras, presentaba genomas de otros agentes externos al objeto de estudio. (Figura N° 7).

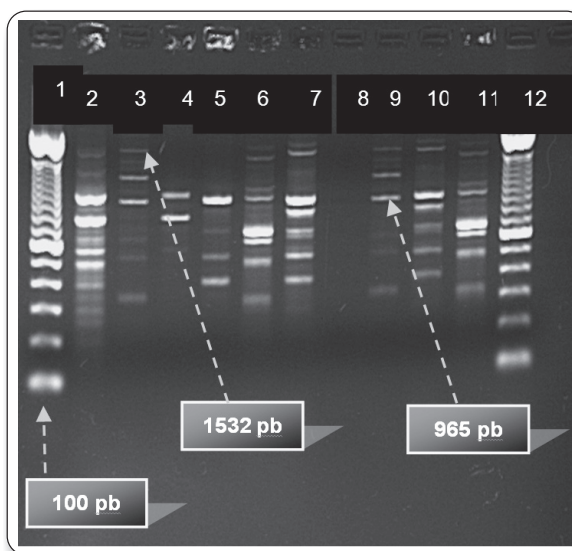
Determinación de la variabilidad genética mediante el uso de la técnica RAPD. Luego

de evaluar los 25 iniciadores propuestos, se obtuvieron ocho (8) productos de amplificación positivos para los aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis*. (Tabla N° 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos positivos para *Mycosphaerella fijiensis*

Primer	Secuencia 5'-3'
OPA2	TGCCGAGCTG
OPA3	AGTCAGCCAC
OPC2	GTGAGGCGTC
OPC5	GATGACCGCC
OPC8	TGGACCGGTG
OPC10	GTGAGGCGTC
OPC11	AAAGCTGCGG
OPH14	GAGCCCTCCA

Figura 8. Análisis electroforético de los productos de RAPD's utilizando el oligonucleótido OPC 5.



En el análisis bioinformático de los aislamientos de la figura N° 8 con el primer OPC 5, se observa un claro patrón de semejanza entre los amplificados de Bochalema (Carril 3

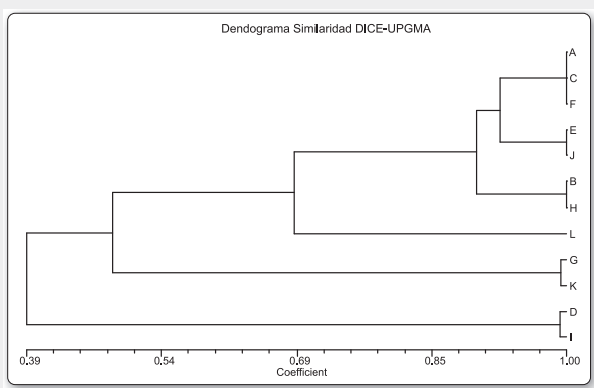
Diagnóstico y caracterización molecular de *Mycosphaerella fijiensis* mediante la técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos (RAPD) y análisis de regiones transcritos internos (ITS´s)

y Carril 9), los de Santander (Carril 4 y 5) y los de Antioquia (Carril 2 y 11), lo cual significa alta similitud entre los genomas estudiados.

Se observó una banda común en los aislamientos 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10 y 11 con peso molecular aproximado de 965 pb, figura N° 8; igualmente, los aislamientos 2, 3, 6, 7, 9 y 10 comparten una banda con un peso aproximado de 1532 pb, Figura N° 8, siendo aislamientos de diferentes regiones del país.

Análisis estadístico

Figura 9. Dendograma de similitud DICE - UPGMA.



El resultado obtenido en la construcción del dendrograma presentó que los aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* del Departamento Norte de Santander (A, C, F, E, J), generaron un agrupamiento, con un porcentaje de similitud de 90%. Igualmente el aislamiento obtenido de Mérida Venezuela (L) usado como Control positivo, presentó un porcentaje de similitud del 70%, confirmando las cercanías genéticas de los aislamientos de Norte de Santander con el aislamiento de Mérida. Los otros aislamientos presentaron una similitud genética de 48% y 35% correspondientes a los Departamentos de Santander (G, K) y Antioquía (D, I) respectivamente. (Figura N° 9).

Conclusiones

Es importante que las muestras foliares

utilizadas para el aislamiento de *Mycosphaerella fijiensis* se encuentren en los últimos estadios de la enfermedad, ya que, en estas últimas etapas se desarrolla el ascocarpo denominado peritecio, el cual contiene las ascosporas usadas para el proceso de aislamiento del patógeno.

Los productos amplificados de las regiones ITS`s universales de *Mycosphaerella fijiensis* obtenidas, generaron un fragmento de 233 pb (ITS A), un fragmento de 360 pb (ITS B) y un producto de 593 pb (ITS Completo), siendo esta información muy importante para desarrollar nuevas secuencias de iniciadores para la detección específica del patógeno.

Se estableció una prueba estándar a nivel molecular mediante iniciadores específicos de *M. fijiensis* para el diagnóstico de este patógeno a partir del micelio del hongo. Los iniciadores MF 137 y R635 generaron un fragmento con un peso molecular de 1050 pb, lo cual concuerda con las pruebas realizadas por Charry, 2002, quien practicó el diagnóstico molecular a *M. fijiensis*, obteniendo los pesos específicos de la banda entre 1000 pb a 1080 pb.

Se comprobó la sensibilidad y la especificidad de los iniciadores MF 137 y R635 utilizando el ADN extraído del tejido vegetal infectado, obteniendo un fragmento con un peso molecular de 1050 pb. Con esta amplificación se aportó nuevas herramientas para la detección de *M. fijiensis*, reflejada en la disminución en el tiempo del proceso de detección comparada con la diagnosis molecular a partir del micelio del hongo.

Los productos amplificados de RAPD`s, generaron patrones de semejanza genómicos entre los aislamientos obtenidos de los Departamentos de Norte de Santander, Mérida, Antioquia y Santander. Se presentó un total de 460 bandas, promediando por cada iniciador polimórfico 57 bandas amplificadas, evidenciando la gran variabilidad genética presentada por *Mycosphaerella fijiensis* en cada una de las muestras estudiadas. Los rangos de tamaño en los fragmentos obtenidos en el estudio estuvieron entre 380 pb a 2115 pb.

La visualización de diferentes bandas en los geles permitió elaborar una matriz de presencia ausencia de las mismas; dicha matriz binaria se transfirió al programa NTSYS (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System), versión 1.8 diseñado por Rohlf, 1984 para crear la matriz de similitud mediante el cálculo del coeficiente de Dice. La matriz resultante se analizó con el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para la construcción del dendrograma.

El resultado obtenido en la construcción del dendrograma, presentó una diferenciación marcada entre los aislamientos de cada Departamento con respecto al control positivo (Aislamiento Mérida). En Norte de Santander la similaridad genética fue de un 90%, la de Mérida fue de un 70%, en Santander de un 48% y Antioquía de un 35%.

Agradecimientos

Al personal del Instituto Colombiano Agropecuario por su colaboración para la realización de esta investigación científica.

Bibliografía

AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. Editorial Limusa Noriega. 2da Edición, México.

CASTIBLANCO, N and ANGEL, J. 2004. Caracterización molecular y análisis polimórfico de aislamiento de *Rhizoctonia solani*, provenientes del cultivo de la papa en Cundinamarca y Nariño. ICA INFROMA. Vol 25 pág 12 – 25.

CHARRY, C. 2001. Comparación entre dos métodos diagnóstico basados en técnicas de biología molecular para la identificación de *Mycosphaerella fijiensis*. Trabajo de grado. Universidad Javeriana. Bogotá.

GRISALES, F. 1997. La Sigatoka Negra y la producción del plátano en la zona cafetera

central de Colombia. Revista Cenicafe. Vol 2, pág 5 – 9.

LOPEZ, J. 2004. Determinación de la variabilidad genética entre aislamientos de *Rosellinia pepo* y *Rosellinia bunodes* mediante la Técnica de amplificación aleatoria de polimorfismos DNA (RAPD) y análisis de espaciadores internos (ITS).

RUIZ, S. 1997. Efecto en el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* mediante el uso de diferentes sustratos y medios de cultivo. Tesis de grado. España. Pág 120.

SARMIENTO, I & ANGEL, J. 2004. Análisis y caracterización molecular de polimorfismos genéticos en aislamientos de *Rosellinia* sp., procedentes de tres zonas productoras de papa. ICA INFORMA. 25: 8 – 14.

STOVER, R. 1962. Intercontinental Spread of banana leaf spot *Mycosphaerella fijiensis*. Tropical Agriculture. 39: 327 – 338.

STOVER, R. 1968. Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella fijiensis*: Perithecia and sporodochia production in different climates. Tropical Agriculture, 45: 234 – 256.

STOVER, R. 1978. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. Tropical Agriculture, 53: 110 – 114.

UNIVALLE – UPEC. 2001. Banana leaf spot (*Mycosphaerella fijiensis*) on the FHIA I variety in Colombia. Revista Agrícola Univalle. 16:18 – 25.