

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA
EN AISLADOS DE *Mycosphaerella fijiensis* RECOLECTADOS EN
LA ZONA SUR DEL LAGO DE MARACAIBO

bdigital.ula.ve

JOSÉ GREGORIO CASTILLO RANGEL

Mérida-2004

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA
EN AISLADOS DE *Mycosphaerella fijiensis* RECOLECTADOS EN
LA ZONA SUR DEL LAGO DE MARACAIBO**

bdigital.ula.ve

Trabajo especial de grado presentado por el
Br. José Gregorio Castillo Rangel,
como requisito parcial para optar al título
de **Licenciado en Biología**

Mérida-2004

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y QUÍMICA CELULAR (**GeQuimCel**), DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, BAJO LA TUTORÍA DEL PROF. **MANUEL DAGERT BOYER** Y CON FINANCIAMIENTO DEL FONACIT PROYECTO N° G-97000700.

bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso por permitirme terminar esta etapa de mi vida, y renovar mi fe en la vida.

A mis padres, Aníbal José Castillo y María Justina Rangel por apoyarme en todo momento, y darme la oportunidad de estudiar en una gran universidad.

A mis hermanos, José Luis, Aníbal Rafael, Juan Carlos, Rosa Elena y José Antonio, por tenerme siempre presente en sus corazones y en sus oraciones.

A mis tíos y tías, Italo, Rogelio, Rafael, Rosa, Amelia, Estelia y Angela, por estar siempre pendientes de mi.

A la preciosa ciudad de Mérida por acoger a tantos estudiantes provenientes de todos los rincones de nuestro hermoso país.

A la Ilustre Universidad de los Andes, por ser ente formador de profesionales para el futuro de nuestro país.

Al FONACIT por el financiamiento aportado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Manuel Dagert Boyer, por ser mi paciente y comprensivo tutor durante este largo camino y por inculcarme sus grandes ideas para la realización de este trabajo.

Al Lab. GeQuimCel y a su coordinador Prof. Francisco Brito, por la formación profesional adquirida.

A los miembros del Jurado que formaron parte de este trabajo: Prof. Jhon Cruz, Prof(a). María Elena García y el Prof. Juan Puig.

A mis amigos de siempre, Armando de Jesús y Luz Thais, por compartir experiencias, en las buenas y malas, que me permitieron crecer durante toda la carrera.

A mí apreciada amiga Katherina, por compartir muchos momentos de la carrera.

A María Marcano, Oliva Moreno, Sonia Morales y María Theresa Hoyer por tenderme su mano amiga y estar siempre conmigo.

A toda la generación de amigos de la carrera, por haber formado parte de mi vida.

A mis amigos y compañeros de residencias, por compartir el día a día de la vida.

A los buenos amigos que aparecieron en algún momento de mi vida en la ciudad de Mérida.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS.....

bdigital.ula.ve

DEDICATORIA

*A mis queridos padres y hermanos
que jamás me abandonaron,
y que siempre se sacrificaron por mí
en este largo camino hoy culminado.*

*A mis queridos sobrinos y sobrinas
a quienes amo.*

A mí por lograrlo.

ÍNDICE

RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN	01
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
METODOLOGÍA GENERAL	32
.- Material Biológico (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>)	33
.- Replica de micelio en medio líquido V8 a partir de cuña	36
.- Extracción de ADN genómico de los aislados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	36
.- Cuantificación de ADN de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	37
.- Identificación molecular de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> con la técnica de PRC	38
.- Determinación de polimorfismo en el ADN genómico de cada aislado de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	39
.- Electroforesis en geles de agarosa	40
.- Analisis de los datos	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIÓN	72
PERSPECTIVA	73
BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXOS	80

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. MATERIAL BIOLÓGICO	28
Tabla 2. MEDIOS DE CULTIVO	28
Tabla 3. SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	28
Tabla 4. CONDICIONES DEL PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>MYCOSPHAERELLA FIJENSIS</i>	29
Tabla 5. “PRIMERS” DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	29
Tabla 6. PROGRAMA DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>M. FIJENSIS</i>	29
Tabla 7. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA RAPD- PCR	30
Tabla 8. PROGRAMA RAPD-PCR	30
Tabla 9. CONDICIONES PARA LA ELECTROFORESIS	30
Tabla 10. LISTA DE “PRIMERS” PCR-RAPD (10mers)	31
Tabla 11. Ubicación geográfica de los sectores (A3 y A4) de la finca Hoya Grande	33
Tabla 12. Valores de concentración de ADN <i>Mycosphaerella fijiensis</i> para el sector Hoya Grande Zona Húmeda (HGZH)	44
Tabla 13. Valores de concentración de ADN de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> para el sector Hoya Grande Zona Seca (HGZS)	45
Tabla 14. Secuencia y porcentaje de Guanina-Citosina para el conjunto de “primers” con patrón de bandeo	48
Tabla 15. Amplificación empleando un conjunto de “primers” para ambos muestreos (+)=amplifico, (-) = no amplifico	49
Tabla 16. Patrón de bandeo monomórfico (M) y polimórfico (P) para el conjunto de “primers” para ambos muestreos	50
	50

Tabla 17. Valor máximo y mínimo de similitud con el índice de Jaccard y número de “cluster” en el dendograma para los “primers” analizados para cada zona de muestreo 52

Tabla 18. Valor máximo y mínimo de similitud con el índice de Dice y Jaccard, y número de “cluster” en el dendograma para el conjunto de “primers” analizados para cada zona de muestreo 54

Tabla 19. Valor máximo y mínimo de similitud con el índice de Dice y Jaccard, y número de “cluster” en el dendograma para el conjunto de “primers” analizados para Hoya Grande 56

bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación geográfica de los sectores (A3 y A4) en la zona Hoya Grande	34
Figura 2. Esquema del muestreo jerárquico	35
Figura 3. Localización de los “primers” de PCR en el ADN ribosomal fúngico	38
Figura 4. Identificación molecular de aislados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> correspondientes a HGZH y HGZS, a través de los productos amplificados por PCR con los “primers” MF137/R635, corridos en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb	81
Figuras 5 y 6. Identificación molecular de aislados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> correspondientes a HGZH y HGZS por separado, a través de los productos amplificados por PCR con los “primers” F137/R635, corridos en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb	81
Figura 7. Perfil electroforético de la estandarización del ADN de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a las concentraciones de 25ng (1ng/μl), 50ng (2ng/μl), 100 ng (4ng/μl) y 150 ng (6ng/μl); correspondientes a HGZH y HGZS, corridos en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb	82
Figura 8. Perfil electroforético de la estandarización de dNTPs a las concentraciones de 100-200 μM con el ADN de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a las concentraciones de 25ng (1ng/μl), 150 ng (6ng/μl); correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb	82
Figura 9. Perfil electroforético de la estandarización de la Taq polimerasa a 1 y 2 U con el ADN de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a las concentraciones de 25ng (1ng/μl), 50ng (2ng/μl) correspondientes a HGZH y HGZS, corridos en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb	83
Figura 10. Perfil electroforético del “set” de 50 “primers” con el ADN de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb	83
Figura 11. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 104 con el ADN de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb	84

Figura 12. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 108 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 84

Figura 13. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 111 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 85

Figura 14. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 115 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 85

Figura 15. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 117 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 86

Figura 16. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 119 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 86

Figura 17. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 125 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 87

Figura 18. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 127 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 87

Figura 19. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 129 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 88

Figura 20. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 135 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 88

Figura 21. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 137 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 89

Figura 22. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 138 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 89

Figura 23. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 149 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 90

Figura 24. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 103 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 90

Figura 25. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 104 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 91

Figura 26. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 105 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 91

Figura 27. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 106 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 92

Figura 28. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 108 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 92

Figura 29. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 111 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 93

Figura 30. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 115 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 93

Figura 31. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 125 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 94

Figura 32. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 127 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 94

Figura 33. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 135 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 95

Figura 34. Perfil electroforético con el “primer” UBC: 138 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa al 1% por 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb 95

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la variabilidad genética intraespecífica en *Mycosphaerella fijiensis* a partir de aislados obtenidos de muestras recolectadas en plantaciones de cultivo de bananas afectadas con sigatoka negra, en regiones escogidas de la zona Sur del Lago de Maracaibo, específicamente en el sector Hoya Grande Zona Húmeda (**HGZH**) y Hoya Grande Zona Seca (**HGZS**). Para llevar a cabo este estudio, la etapa primordial para la determinación de variabilidad genética fue la obtención de cultivos monoascospóricos de cada uno de los veinte aislados que componen el muestreo jerárquico de *Mycosphaerella fijiensis* para ambas zonas del sector Hoya Grande. La obtención de este banco de aislamientos ascospóricos de *Mycosphaerella fijiensis* es crucial, debido a que cada aislado es el portador de un contenido genómico único, que representa y corresponde a un clon genéticamente uniforme de una célula fúngica individual. Estos veintea aislados se agrupan en cinco niveles jerárquicos, formados por cuatro miembros.

Se utilizó el PCR y PCR-RAPDs para identificar molecularmente a los aislados de *M. fijiensis* y detectar polimorfismo genético en el ADN del hongo. La identificación molecular permitió observar el resultado esperado, que se correspondió con el tamaño del producto a amplificar de 1kb. El polimorfismo determinado dentro de cada muestreo con el paquete NTSYS fue limitado, debido a que se utilizó un número reducido de “primers”; sin embargo, se logró observar diferencias génicas a nivel de zona de muestreo.

ABSTRACT

The main goal of this work was to study the intraespecific genetic variability of *Mycosphaerella fijiensis* isolates collected from comercial banana orchards south to Lake of Maracaibo, in the areas known as Hoya Grande Zona Húmeda (HGZH) and Hoya Grande Zona Seca (HGZS). To attain our objectives of establishing the genetic variability of the fungus we focused our efforts on the generation of monoascosporic cultures from each of twenty different isolates that comprise the hierarchic sampling of *M. fijiensis* from both geographical areas. Obtaining pure monoascosporic cultures is fundamental for this type of análisis since every isolates must harbor a unique genomic unit which represents a single fangal cell. All twenty isolates were grouped in five hierarchic levels, each of them comprised by four members.

PCR and RAPD análisis were used to molecularly identify all *M. fijiensis* isolates and to detect molecular polymorphisms in the fangal DNA. Molecular identification allowed testing the expected results by the generation of an amplified band 1 Kb. Long. Polymorphism, as established using the NTSYS software, was low since a very few primers were used to perform the análisis; genetic variations, however, were observed between the geographical sampling areas.

INTRODUCCIÓN

Los historiadores agrícolas creen que entre las primeras plantas domesticadas se encuentran los bananos, palabra probablemente de origen arábigo que significa “dedo”, o de origen africano (Costa Occidental de África). Aún antes de este período, es posible que los primeros pescadores en el Sudeste de Asia y el Pacífico: CENTRO INDO – MALAYO (Indochina y archipiélago malayo), donde los bananos tienen su origen y se cultivan desde hace 8000 años, utilizando sus ancestros silvestres. Los pseudotallos de estas hierbas de la jungla proporcionaban a los pescadores la fibra, mientras que las hojas servían como material envoltorio, y la parte interior de las vainas foliares y la bellota, como alimento (INIBAP, 2003; Crane & Belardi, 1972).

Se cree que el banano se introdujo en África en tiempos prehistóricos; se menciona por primera vez en los textos budistas de los años 500-600 A.C., y es conocido por referencia oral en el mediterráneo en el siglo III A.C. Es introducido en el siglo X D.C en Europa y, más recientemente, en Sudamérica a principios del siglo XVI, por los colonos españoles y portugueses, que trajeron las plantas desde la costa de África occidental. Estas migraciones, exploraciones e inicio de comunicaciones entre regiones permitieron una paulatina diseminación del banano y la asimilación de esta planta por otras etnias o culturas, resultando en una distribución actual bastante generalizada en el ámbito mundial, haciendo que hoy en día parezca como cosmopolita (Crane & Belardi, 1972).

Actualmente, la palabra “banano” es un término general que se utiliza para designar un número de especies e híbridos en el género *Musa*, familia *Musaceae*,

que son utilizados en todo el mundo, incluyendo los plátanos. Los bananos provienen de especies silvestres seminíferas fundadoras que crecían en Indochina, región donde existe hoy en día una rica diversidad tanto de especies silvestres como cultivadas. En condiciones naturales, poco se conoce sobre la diversidad y estado de las especies silvestres de bananos. Se piensa que surgieron como resultado del aislamiento geográfico y del desarrollo de barreras reproductoras naturales dentro de las especies silvestres no comestibles, de fruto pequeño con numerosas semillas, originando la diferenciación genética en varias subespecies. A través del tiempo, el genoma de estos bananos silvestres ha permanecido invariable, debido a que durante su reproducción no hay intercambio genético, por tanto se cree que las fuentes de esta diversidad silvestre son las especies: ***Musa acuminata***, muy polimorfa con nueve subespecies, todas provenientes de la península de Malasia e islas cercanas (Horry, 1989 citado por Carlier, 1989-1990), y ***Musa balbisiana***, menos polimorfa y cuyo origen se ubica en el norte del sudeste asiático, India y las islas de Filipinas. Posteriormente, el siguiente y decisivo paso en la evolución del banano comestible fue el origen de la partenocarpía y la desaparición de la semilla, principalmente en el fruto de la especie ***Musa acuminata***, proceso que se originó a través de una serie de cambios genéticos, con la aparición de caracteres poliploides debido a mutaciones y/o hibridaciones naturales que involucraron a una o ambas especies (***Musa acuminata*** y ***Musa balbisiana***). Los cambios finales se basaron en la selección y mezcla de cultivares por los campesinos asiáticos, quienes diversificaron los grupos híbridos mediante cruzamientos de ***Musa balbisiana*** con linajes comestibles de ***Musa acuminata***,

contribuyendo así con una mayor diversidad del banano cultivado. La mayor cantidad de estos grupos híbridos también se encuentra alrededor del área principal de evolución de las bananas silvestres, el Sudeste Asiático.

El banano, cuyo fruto es una baya para los botánicos, taxonómicamente pertenece al orden **Zingiberales**, que comprende las familias **Musaceae**, **Strelitziaceae**, **Zingiberaceae**, **Marantaceae** y **Cannaceae**. La familia de las **Musaceae** incluye dos géneros: El género **Musa** (asiática), que es relativamente pequeño cuyo número de especies es impreciso (50-35), principalmente asiáticas, y el género **Ensete**, con 7 especies, predominantemente africanas (INIBAP, 2001 a). Los géneros **Musa** y **Ensete** comprenden monocotiledóneas herbáceas de gran tamaño con tallo subterráneo rizomatoso o bulboso (cormo); este es un tallo subterráneo erecto, con poco crecimiento horizontal, del que parten grandes hojas que poseen una parte basal bien determinada (vaina foliar); estas vainas están dispuestas helicoidalmente fuertemente apretadas unas a otras, constituyendo el falso tronco (pseudotallo). Algunas especies producen frutos sin semillas, perpetuándose por vía vegetativa, a través de la producción de uno o varios retoños o hijos (ramificaciones laterales) que sustituirán a la planta madre una vez muerta, cosa que ocurre después de la maduración de los frutos (Stover & Simmonds ,1987).

El género **Musa** se divide en cinco secciones: Callimusa, Australimusa, Eumusa, Ingentimusa y Rhodochlamys (Chessman, 1948). Ingentimusa es un miembro poco importante, y las especies de las secciones Callimusa y Rhodochlamys sólo son de interés ornamental, ya que no producen frutas

comestibles. En la sección Australimusa, la especie ***Musa textilis*** (Abacá, cáñamo de Manila) es el miembro más importante desde el punto de vista económico. La sección Australimusa también incluye un grupo de cultivares comestibles muy poco conocidos, llamados colectivamente bananos Fe'i (INIBAP, 2001 a). La sección Eumusa contiene unas 11 especies, con un número básico de cromosomas ($n=11$); las especies más importantes son ***Musa acuminata Colla***, especie que existe naturalmente como diploide ($2n=22$) y triploide ($3n=33$); y ***Musa balbisiana Colla***, especie diploide ($2n=22$). Eumusa es la sección más grande, la más propagada geográficamente, y donde están todas las variedades de banano cultivadas en la actualidad (Devouard, 2001). Estos cultivares se diferencian principalmente por la constitución de sus genomas (ploidía) y por sus características morfológicas, en especial la de sus racimos.

La nomenclatura para referirse a la variabilidad clonal de los bananos (cambures y plátanos) fue realizada primero por Linneo, quien clasificó al género ***Musa*** en dos especies: ***Musa sapientum*** ("Cambur manzano" en Venezuela) y ***Musa paradisiaca*** ("French Plantain", o "Plátano Hartón Dominicó" de Venezuela). La costumbre más corriente es la de aplicar el primer término a las bananas que se comen crudas y el segundo a las que se cuecen; sin embargo, esta distinción entre bananas y plátanos es artificial y confusa; más claramente, las bananas y plátanos se refieren a ciertos subgrupos de cultivares con una determinada constitución genómica dentro del género ***Musa***, posteriormente los trabajos de Chessman (1948) determinaron la intervención de las especies ***Musa acuminata*** y ***Musa balbisiana*** en el origen de los bananos comestibles. Simmonds y Shepherd en el

año de 1955, comprobaron la contribución de estas dos especies en el origen interespecífico de los cultivares, por medio de estudios taxonómicos basados en quince caracteres morfológicos, y la contribución genómica de los parentales: *Musa acuminata Colla* (genoma **A**) y *Musa balbisiana Colla* (genoma **B**), a la expresión fenotípica del cultivar considerado. Finalmente, Stover y Simmonds (1987) clasificaron los cultivares en grupos y subgrupos, según su origen genómico y nivel de ploidía.

A grandes rasgos, la clasificación del banano es en grupos y subgrupos:

- A. — Clones con genomas acuminata:**
1. - Diploides (**AA**).
 2. - Triploides (**AAA**).
 3. - Tetraploides (**AAAA**).
- B. — Clones con genomas acuminata y balbisiana:**
- 1.- Diploides (**AB**)
 2. - Triploides con dominancia acuminata (**AAB**).
 - 3.- Triploides con dominancia balbisiana (**ABB**).
 4. - Tetraploides (**ABBB**).

Hay que señalar que existe una gran cantidad de cambures y plátanos producto de mutaciones somáticas.

El cultivo de los bananos comestibles está restringido a las regiones tropicales y subtropicales, aproximadamente ubicadas en el área comprendida entre las latitudes 30° norte y 30° sur. Dentro de esta banda, existe una variedad de climas con diferentes períodos de estación seca, diferentes grados y patrones de

precipitación, donde ellos prosperan y producen fruta durante todo el año, proporcionando así una fuente continua de alimento. Un clima adecuado para el banano es de aproximadamente 26°C y una pluviosidad de 100 mm. por mes, con una estación seca que no debe ser de más de tres meses (Crane & Belardi, 1972).

En Venezuela las condiciones climáticas predominantes para el cultivo del plátano son: precipitaciones de 700-4000 mm. /año, generalmente con presencia de dos meses secos separados, y temperaturas medias anuales superiores a 21°C. La zona Sur del Lago de Maracaibo presenta las condiciones idóneas para el cultivo de plátano, con temperaturas medias que oscilan entre 24 y 28,8 °C. y precipitaciones que fluctúan entre 1300 y 2600 mm. anuales.

El humilde banano sigue teniendo un profundo significado cultural en muchas partes del mundo, debido a su reproducción continua, es considerado símbolo de fertilidad y prosperidad por muchas comunidades de África y Asia (especialmente en la cultura hindú), las hojas y frutos son depositados en las escaleras exteriores de las casas donde ha tenido lugar un matrimonio, las mujeres malayas se bañan con una cocción de hojas de banano durante 15 días después del alumbramiento, los primeros hawaianos usaron las plántulas como bandera de tregua en las guerras; la planta de banano se siembra en las esquinas de los arrozales como un amuleto protector, además se usa en la producción de alcohol, como fuente de fibra, y con fines medicinales y de cosméticos. Aunque el banano se conoce mejor como un cultivo alimentario, casi cualquier parte de la planta puede ser utilizada de una manera u otra. Esto puede explicar porque en la India el banano se conoce

popularmente como “kalpatharu”, que significa “hierba con todos los usos imaginables” (INIBAP, 2001 b).

De los alimentos consumidos por el hombre el banano ocupa el cuarto lugar, luego del arroz, el trigo y la leche, teniendo en consecuencia un papel preponderante en la seguridad alimentaría, principalmente de los países productores y en vías de desarrollo. Además origina un intenso comercio internacional, siendo el segundo fruto después de la naranja y representando el cuarto cultivo en importancia después del arroz, el trigo y el maíz, con relación al volumen de exportaciones (Ortiz & Vuylsteke, 1996).

Los bananos comerciales (más de 300 cultivares diferentes), especialmente los triploides del tipo (**AAA**), (**AAB**) y (**ABB**), tales como Cavendish, banana de exportación, plátano “Hartón” y Bluggoe respectivamente, son de considerable importancia para la agricultura de las regiones tropicales e intertropicales de África, América y Asia (FAO, 1999). Para más de 400 millones de personas en los países en vías de desarrollo, los bananos son un alimento básico esencial, fuente principal de carbohidratos, además dentro del sector primario es una de las más importantes fuentes de divisas para la economía de los países productores (Robinson, 1996).

La bananicultura agrupa a los llamados bananos dulces de postre, aquellos de consumo fresco, y los bananos de cocción (plátanos y topochos), aquellos que se hierven, se hacen al vapor, se fríen o se asan. Tanto los bananos como los plátanos a menudo se fríen para producir las tajadas o “chips”. Un ejemplo de lo vital de este cultivo es que en algunas partes de Uganda las rodajas secas de la fruta verde se

almacenan para los tiempos de hambruna, proporcionando así una fuente continua de alimento, aun durante este período entre las cosechas de otros cultivos.

Los bananos producen el más alto rendimiento a los más bajos costos, son fáciles de cultivar y no necesitan ser replantados cada estación, se cultiva en más de 120 países, con una producción estimada de 85,5 millones de toneladas a nivel mundial, de las cuales 20,5 millones corresponden a Latinoamérica, y un 7% de las mismas es aportada por Venezuela. En la franja del trópico húmedo bajo de África, Centroamérica, el Caribe y Sudamérica se originan las mayores producciones, así como los más altos índices de consumo per cápita. Existen algunas variaciones entre los valores de consumo, debido a las costumbres de cada región en particular, que definen estas preferencias (FAO, 1998).

La producción bananera para el mercado internacional consiste casi exclusivamente del banano de postre (banano de exportación), en el ámbito industrial es cultivado intensivamente como monocultivo, pero a menudo es también cultivado por pequeños agricultores; este mercado representa sólo el 12% de la producción mundial. Los principales países productores son: Ecuador, Costa Rica, Honduras, Colombia, Panamá, Las Antillas, Costa de Marfil, Camerún y Filipinas. La producción destinada al mercado interno, que es importante para la alimentación básica de numerosos países de América- Latina, África y Asia, consiste tanto del banano de postre como del banano de cocción; casi el 90% es cultivado por pequeños agricultores para el consumo y comercio local y la producción es adaptada a los sistemas de monocultivos, multicultivos y agricultura mixta con el ganado. Existe también una producción periurbana de autoconsumo que consiste

de una producción de bananos en los patios de las casas y en espacios sin utilizar en las ciudades (INIBAP 2001 b).

En Venezuela, la siembra se basa exclusivamente en el plátano (Musa **AAB**, subgrupo plátano cv. Hartón) y el banano tipo “Cavendish” (Musa **AAA**), pero de estos, el plátano es considerado el rubro agrícola más importantes para el país por su producción y consumo. La superficie sembrada de banano en el país aporta el 50% del valor de la producción frutícola, parte de ella es exportada. Las plantaciones de plátano en Venezuela están establecidas con el clon Hartón, mayormente el llamado Hartón verde, aunque se encuentra en algunas áreas los clones Hartón Negro o Hartón Morado (Nava, *et al.* 1998). El área sembrada de plátano en el país es de 25.000 ha., de las cuales el clon Hartón ocupa el mayor porcentaje de estas, ubicadas en la cuenca Sur del Lago de Maracaibo, constituidas por zonas de los estados Zulia, Mérida, y Trujillo. Para el Sur del Lago de Maracaibo, el cultivo del plátano representa una actividad de importancia estratégica para el desarrollo de la región y del país por generar el sustento directo de 30.000 familias y de 40.000 personas indirectamente (Segovia, 2003 com. pers.), es por ello, que la región Sur del Lago de Maracaibo es propicia para llevar a cabo estudios de cualquier naturaleza sobre el cultivo de plátano.

Desde sus orígenes, las plantas han estado expuestas a condiciones ambientales adversas, estrés por agentes abióticos y bióticos (patógenos), que inducen en las plantas mecanismos de defensa en respuesta a estos agentes, para protegerse de lesiones o enfermedades. Las enfermedades producidas por los agentes biológicos (hongos, virus, bacterias) ya estaban presentes en las formas

ancestrales de los cultivos, antes del comienzo de la práctica agrícola; desde entonces se hicieron más severas y llegaron a ser de preocupación humana cuando limitaron el rendimiento de sus cosechas, aunado con el hecho de que una misma clase de cosecha vegetal puede estar afectada por varias enfermedades (Agrios, 1997).

Muchas de las plagas y enfermedades que amenazan a los cultivos de bananos alrededor del mundo también tienen su origen en la región de evolución del banano (Buddenhagen, 1987). Como resultado de la coevolución patógeno-hospedador, existe una diversidad de enfermedades en el banano, de sus agentes causales y tipos de patrones de interacciones (incompatible y compatible) hospedador-patógeno, que en el curso de la evolución determinaron la resistencia o no a las enfermedades según la teoría o modelo gen a gen propuesta por Flor en el año de 1947 (Lamb, 1994; Thompson & Burdon, 1992).

Entre las enfermedades que atacan el banano se destacan las siguientes:

A.- Vírales: Clorosis infecciosas-cucumovirus (CMV); rayado necrótico-badnavirus (BSV); banana "bunchy top virus" (BBTV); banana "bract mosaic virus" (BBrMV) y banana "streak virus" (BSV) (Lavendy 1992-1993; Urdaneta, 1991).

B.- Bacterianas: Hereque o moko (*Ralstonia solanacearum*); pudrición acuosa del pseudotallo (*Erwinia carotovora* y *E. Chrysanthemi*); pudrición del cormo y cogollo (*Pseudomonas sp.* y *Erwinia sp.*) (Lavendy 1992-1993).

C.- Fúngicas: Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*); Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*); "Septoria leaf spot" (*Mycosphaerella eumusae*) manchas del follaje (*Cordana musae*); mancha o rayado del envés (*Veronaea*

musae); mancha irregular oscura de la hoja (*Deightoiella torulosa*); salpicado de la hoja (*Periconiella musae*); "banana fleckle" (*Phyllosticta musarum* (Cooke) van der Aa); "banana leaf spot" (*Guignardia musae*); Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* fr. Cubense); pudrición seca del tallo (*Marasmiellus troyanus*); enfermedades del fruto (*Verticillium theobromae*, *Colletotrichum musae*, *Pyricularia grisea*, *Deigtoniella torulosa*, *Botryodiplodia theobromae* y *Fusarium roseum*) (Lavendy, 1992-1993).

D.- Nemátodos: (*Radopholus similis*, *Pratylenchus spp.*, y *Helicotylenchus multicinctus*), parásitos del banano que causan serias pérdidas en todas las regiones tropicales ((Lavendy, 1992-1993; Bridge *et al.* 1997).

Entre estos agentes causales de enfermedades en el banano, los hongos causan las mas serias, se caracterizan por ser más complejos y diversos que cualquiera de los otros patógenos. A nivel global, las enfermedades fúngicas más importantes en el banano son el Mal de Panamá y la Sigatoka, enfermedades que amenazan la producción y el futuro agrícola de los bananos.

La enfermedad "Mal de Panamá" producida por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, ataca el sistema radicular de la planta, invadiendo así a toda la platanera, impide la normal alimentación de la hoja, ocasionando una progresiva marchitez y, finalmente, la muerte de la planta.

A nivel mundial, se conocen colectivamente con el nombre de Sigatoka las dos enfermedades foliares más destructivas del banano que difieren en su sintomatología y epidemiología; son de origen fungoso, causadas por patógenos del mismo genero: *Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder, agente causal de la

Sigatoka amarilla, y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la raya negra o estrías negras, posteriormente conocida como Sigatoka negra. Estas enfermedades no eliminan al hospedero, destruyen el área fotosintética de la hoja de banano, reducen el vigor de la planta, a través del desarrollo de distintos tipos de lesiones que constituyen los diversos síntomas de la enfermedad, cuya fase final se caracteriza por la presencia de manchas necróticas que causan, por consiguiente, una drástica reducción del área foliar y que, según la severidad y duración del ataque al follaje, este puede quedar totalmente inservible para los procesos fotosintéticos, ocasionando que el fruto madure precozmente sin haber alcanzado el peso y tamaño adecuados; los dedos quedan angulosos y delgados con maduración irregular, provocando al final, una reducción sustancial en la producción de banano y racimos de mala calidad (Merchán, 1996).

La Sigatoka amarilla o clásica fue identificada primero en Java por Zimmermann en el año de 1902, posteriormente, en el año de 1912, se registró en el valle de Sigatoka, isla de Viti Levu-archipiélago de Fiji, de donde deriva su nombre. Durante los siguientes 40 años, la enfermedad se expandió por todas las regiones bananeras del mundo, convirtiéndose en una epidemia global y, por tanto, en una de las enfermedades foliares más serias del banano (Carlier, 1989-1990).

La Raya negra, primer nombre de la enfermedad, que hace referencia a los síntomas iniciales observados en la hoja, es la enfermedad que actualmente causa la más severa necrosis en el follaje del banano y es la forma más virulenta del complejo Sigatoka, hoy en día es catalogada como la más seria enfermedad de las musáceas. Se reportó por primera vez en el año de 1963, en la isla Viti Levu,

archipiélago de Fiji, Pacífico Sur (Rhodes, 1964), con el nombre original de estrías negras o raya negra, de donde se diseminó y reemplazó progresivamente a la Sigatoka amarilla, constituyéndose en la más seria enfermedad del follaje en las regiones del Pacífico, sureste de Asia y Filipinas; comportamiento que se presenta en forma similar en la mayoría de las regiones bananeras y plataneras del mundo. El primer estudio detallado sobre la enfermedad y el patógeno causante de ésta fue hecho por Meredith y Lawrence (1969).

El registro cronológico de su distribución geográfica mundial según Lavendy (1992-1993), indica que en África, se observó por primera vez en Zambia, en 1973; posteriormente, se distribuyó en dos ejes, el primero hacia el África Occidental: Gabón en 1978, Camerún en 1980, Nigeria en 1986 y Togo en 1988. El segundo frente se dirigió hacia el África central y oriental: Congo en 1985, Zaire, Rwanda, Burundi, Kenia, Uganda y Tanzania en 1987, hasta las islas de Pemba y Zanzíbar. En Oceanía, se observó en Australia en 1982. Su ingreso a América Latina es incierto, se registró por primera vez en 1972, en Honduras, aunque ya existían citas del patógeno desde 1969; Belice en 1975, Guatemala y Costa Rica en 1977; Salvador y Nicaragua en 1979; Panamá y las regiones sur de México en 1978; Colombia en 1981; norte de Ecuador en 1986. La ruta parece luego progresar hacia Venezuela.

En Venezuela, la Sigatoka negra fue detectada en noviembre de 1991 en la finca El Oro, Municipio Catatumbo, estado Zulia. El foco inicial fue observado en la confluencia del río Oro con el río Catatumbo, a una altitud de 100 msnm y en la línea fronteriza con la República de Colombia. La diseminación se debió, además

de los factores humanos y meteorológicos, al arrastre de material infectado por las corrientes del Catatumbo. Para diciembre de 1992, ya se había extendido a los estados Mérida, Trujillo y Barinas; en el período 1994-97, se extendió a los estados Yaracuy, Carababo, Portuguesa, Aragua, Miranda, Sucre, Bolívar y Delta Amacuro (Hernández *et al.*1997).

Ambas enfermedades (Sigatoka negra y amarilla) se diferencian visualmente en las etapas iniciales de desarrollo de los síntomas, la Sigatoka amarilla produce primero rayas amarillas, las cuales no son tan pronunciadas en el caso de la Sigatoka negra; además, la Sigatoka negra causa más daño, es más difícil de controlar que la Sigatoka amarilla y tienen un rango más amplio de hospederos, que incluye a otros cultivares de banano, que no son atacados por la Sigatoka amarilla; sin embargo, ante una fuerte infección con Sigatoka amarilla, es casi imposible distinguir entre las dos únicamente por los síntomas.

La evolución de los síntomas de la enfermedad fue caracterizada por Fouré (1982), quien describe la enfermedad por estados. Los síntomas de la Sigatoka negra varían en función del estado de desarrollo de la planta, del cultivar de banano y de la severidad del ataque. En condiciones desfavorables, los síntomas pueden confundirse con los de la Sigatoka común por presentar manchas relativamente aisladas. En cultivares susceptibles, la Sigatoka negra se reconoce por la gran cantidad de rayas o estrías y manchas definidas de color café a negro que pueden cubrir el área foliar desde la tercera hoja más joven hacia abajo. Normalmente, la enfermedad evoluciona a través de seis estados (Merchán, 1996), con las siguientes características:

Estado 1. Pequeñas decoloraciones menores de 1mm de longitud de color blanco-amarillento, visible sólo en el envés de la hoja.

Estado 2. Rayas de 2-3 mm de longitud de color café rojizo, visibles primero en el envés y luego en el haz, donde varían de color amarillo a café y negro. Conservan el color café rojizo sólo en el envés. En este estado se inicia la formación de conidios, cuya producción se prolonga hasta la iniciación del estado seis.

Estado 3. Las rayas o estrías se alargan y amplían, dando la impresión de haber sido pintadas con pincel. En ocasiones desfavorables pueden alcanzar de 2 a 3 cm. de longitud.

Estado 4. Manchas ovales de color café en el envés y negro en el haz.

Estado 5. Manchas negras rodeadas de un halo amarillento y centro semihundido.

Estado 6. Manchas con centro hundido de color blanco grisáceo, donde a simple vista se pueden observar los peritecios o cuerpos productores de ascosporas.

En períodos favorables para la enfermedad, la hoja se quema y ennegrece en poco tiempo, sin presencia de lesiones aisladas en los estados 5 y 6.

El desarrollo de la enfermedad de la Raya negra necesita una humedad relativa superior a 90% y una temperatura de al menos 20°C, aproximadamente, pero el rango óptimo de temperatura está entre 25-30°C. Según las condiciones climáticas, el ciclo dura de 25 a 50 horas en una variedad sensible (Beveraggi, 1992). En la mayoría de las regiones intertropicales, las condiciones ecológicas son favorables, durante gran parte del año, para el cultivo del banano y el desarrollo de la Sigatoka negra (Beveraggi, 1992; Meredith, 1970; Stover, 1980).

Los patógenos del género ***Mycosphaerella***, el género más grande con más de cien especies, muchas de las cuales son parásitas de las plantas, son hongos ascomycetes que pertenecen al orden ***Dothidiales***, familia ***Dothideaceae***. Se caracterizan por producir ascosporas septadas de color marrón pálido o hialino en el tejido necrosado o muerto del hospedador. Los agentes causales del complejo Sigatoka: ***Mycosphaerella fijiensis*** y ***Mycosphaerella musicola***, son hongos perfectos, heterotáticos, que presentan reproducción sexual y asexual (Mourichon y Zapater, 1990; Stover, 1963 a, b). ***Mycosphaerella fijiensis*** y ***Mycosphaerella musicola*** son las formas correspondientes del estado sexual (teleomorfos), las características morfológicas de sus estructuras reproductivas (peritecios, ascosporas, espermogonios) son similares y no permiten diferenciar las especies (Stover, 1980). Las formas imperfectas (asexual o anamorfo) de estos patógenos corresponden a especies del género ***Paracercosporas*** y ***Pseudocercosporas***, respectivamente. Las características morfológicas de las estructuras reproductivas asexuales (conidióforos y conidios) de ***Paracercosporas fijiensis*** y ***Pseudocercosporas musae*** si permiten su diferenciación (Deighton, 1979). Otra diferencia apreciable es que ***Mycosphaerella fijiensis*** se caracteriza por su mayor patogenicidad en un amplio rango de hospedadores, siendo patogénica en todos los grupos de bananos (**AAA**) y en numerosos cultivares de los genomas **AAA**, **AAB**, **ABB**, y particularmente en el subgrupo “plantain” (**AAB**), que posee alta susceptibilidad a esta especie (Mourichon & Fullerton, 1990).

La fase sexual, *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, y la fase asexual, *Paracercosporas fijiensis* (Morelet) Deighton, presentan las siguientes características:

***Mycosphaerella fijiensis*:** en esta fase el hongo forma una estructura denominada peritecio, el cual es globoso, de color marrón oscuro y de 47-85 micras de diámetro. La parte superior del peritecio presenta una apertura denominada ostiolo. Dentro del peritecio se encuentran las ascas que son especies de sacos, en cuyo interior se encuentran las ascosporas. Las ascosporas son hialinas, fusiformes, bicelulares, de 12,5 a 16 micras de largo y 2,5 a 3,8 micras de ancho (Pons, 1987 & González, 1988).

***Paracercosporas fijiensis*:** en esta fase, el hongo forma, a veces, una agrupación de células irregulares, de color marrón oliváceo, denominado estroma. A partir de células del estroma, se forman dos o más conidióforos cilíndricos, rectos o curvos, de color marrón oliváceo, septados, de 25 micras de largo y 3 a 4 micras de ancho. Los conidióforos también pueden formarse en forma solitaria y en ausencia de estroma o en grupos de 2 a 8 unidades. Sobre los conidióforos se forman células conidiógenas, cilíndricas, rectas o curvas, de color marrón oliváceo, de 25 micras de largo y 3 a 4 de ancho. A partir de las células conidiógenas se originan los conidios subhialinos, obclavados cilíndricos, septados, de 20 a 132 micras de largo y 1,5 a 20 micras de ancho. Cuando los conidios están maduros, se desprenden, quedando una cicatriz moderadamente visible en la célula conidiógena y otra en la base del conidio (González, 1988; González, 1988, Pons, 1989; Pineda y Carrasco, 1995).

Antes de la época en la cual se observó una fuerte epidemia de la enfermedad en plantaciones de banano en el valle de Úlua, Honduras, el término Sigatoka era empleado para referirse al manchado (Sigatoka clásica o amarilla) producido por *Mycosphaerella musicola*, y el término estrías negras para el causado por *Mycosphaerella fijiensis*; posteriormente, el personal de las plantaciones hondureñas al observar una mayor masa o densidad de manchas con una apariencia más oscura en el follaje del banano, con respecto al presentado en la enfermedad de estrías negras, acuñó el nombre de Sigatoka negra para la nueva condición y se describió una nueva variedad de *Mycosphaerella fijiensis*, como agente causal de la enfermedad: *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* (Stover, 1974), y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet se designó como *Mycosphaerella fijiensis* var. *fijiensis*.

Mycosphaerella fijiensis var. *fijiensis* y *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* se diferencian usando como criterio una característica morfológica del estado anamorfo, debido a que 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; a diferencia, el estado anamorfo de la var. *fijiensis* carece de la presencia de estroma. Debido a la semejanza que existe en los síntomas que producen en los tejidos afectados, la diagnosis de estos hongos se basa en observaciones microscópicas; igual ocurre con sus diferencias morfológicas, pero estas diferencias morfológicas son confusas y no consistentes para usarlas como un carácter de valor taxonómico de

separación, por lo que se designan a estos dos hongos con el nombre de ***Mycosphaerella fijiensis*** (Pons, 1987).

En el curso del ciclo infectivo de ***Mycosphaerella fijiensis***, se distinguen tres fases sucesivas: la contaminación, la incubación y el desarrollo de las lesiones. Los conidios y las ascosporas son las estructuras del hongo que inician la contaminación, después del contacto con el hospedador y la germinación de las esporas, comienza una fase epífita que se caracteriza por el crecimiento del tubo germinativo, y finaliza con la penetración estomática. Este fase dura de 2 a 4 días y necesita una humedad saturante con la presencia de agua libre. La fase de incubación corresponde al intervalo de tiempo que separa la penetración estomática y la aparición de los primeros síntomas característicos del estado número 1 (estrías). La duración de esta fase varía de 10 a 15 días, según la cantidad de inóculo (Carlier, 1989-1990). En el curso de la fase de incubación, la hifa micelial, después de que pasa a una cámara subestomática, progresa a los espacios intercelulares del parénquima lagunal de las hojas (Beveraggi, 1992). Esta progresión es antes de que los primeros síntomas aparezcan en el frente necrótico. Las lesiones en estrías evolucionan a manchas necróticas y, consecuentemente, al marchitamiento de la hoja (Fouré, 1982), a través de la evolución en seis estados. Sin embargo, esta división es arbitraria y estos seis estados no se observan en períodos poco favorables a la Sigatoka negra. La velocidad de marchitamiento de la hoja depende de la densidad de los síntomas presentes al final de la fase de incubación (Carlier, 1989-1990) y el marchitamiento de la hoja puede ser muy

rápida, con la aparición, en diez días, de placas necróticas que coalescen en un gran número de lesiones (Carlier, 1989-1990; Lavendy, 1992-1993).

La Sigatoka negra es una enfermedad muy destructora, originando grandes pérdidas económicas si no se realiza un buen manejo del cultivo y si no se toman las medidas preventivas necesarias, por lo que se ha constituido en uno de los problemas que enfrentan los países productores de banano. Se han dedicado grandes esfuerzos al control de la enfermedad en el ámbito internacional, además, de la implementación de estrategias basadas en mejorar la productividad y estabilidad del cultivo de banano para el mercado local y de exportación.

En Venezuela, la enfermedad ha afectado mayormente a los pequeños y medianos productores, planteándose como alternativa la sustitución de este rubro por otros cultivos, tales como yuca, cacao, maíz, pimentón, lechosa, caña de azúcar, aguacate, cítricos, otros. Las consecuencias originadas por la Sigatoka negra en el país han sido la reducción en la superficie sembrada, el aumento en la tasa de desempleo y la sustitución de rubro (Lehmann, 1984; Hernández & Ordosgoitti, 1996).

Entre los métodos de lucha contra la Sigatoka negra, la estrategia de combate más efectivo y utilizado es el control químico (Lepoivre, *et al.* 1993). Este se basa en el uso de fungicidas protectantes y sistémicos. Actualmente, el mayor control se realiza con fungicidas sistémicos, actuando solos o combinados con fungicidas protectantes de amplio espectro, aplicados en ciclos de atomización aérea y complementada con aspersiones terrestres. En la mayoría de los países donde está presente la enfermedad, el control se ha hecho con fungicidas del tipo

benzimidazoles (Cronshaw & Akers, 1990). Estos fungicidas tienen éxito cuando se utilizan para limitar el daño causado por la enfermedad, pero ciclos inadecuados de aplicación, fungicidas o formulaciones no adecuados y deficiencias en las técnicas de aplicación que resultan en una pobre cobertura, pueden originar el desarrollo de epidemias de Sigatoka negra, además de la tendencia a desarrollar resistencia o tolerancia por parte de *Mycosphaerella fijiensis* hacia los fungicidas sistémicos, cuando estos son usados indiscriminadamente (Stover, 1990).

El costo anual de las aplicaciones de fungicidas es de aproximadamente US\$ 1000 por hectárea. Los productores que se dedican a la exportación del fruto, pueden añadir fácilmente estos costos de producción al rubro, pero los pequeños y medianos productores dedicados a la agricultura de subsistencia, no lo pueden hacer debido al alto costo que representa y al número relativamente elevado de aplicaciones para su combate, rebasando su capacidad de producción. Ellos deben optar por estrategias diferentes para hacer frente al problema, como la remoción de hojas viejas (deshoje fitosanitario), lo cual reduce la fuente de inóculo; regulación de la población de banano, a través del deshije y resiembra; control de malezas, manejo y distribución de desechos. Estos son los métodos culturales que constituyen el manejo integrado de la enfermedad, que hacen disminuir la incidencia de la plaga.

Debido al alto costo de los fungicidas y al problema recurrente de la resistencia del patógeno a los mismos, así como también, a los daños causados al medio ambiente, surge la necesidad de abordar esta enfermedad desde el punto de vista genético, basándose en dos aspectos:

1.- Mejoramiento genético del banano que implica la creación de nuevos cultivares resistentes a la enfermedad, y

2.- La elaboración de estrategias de utilización de estos cultivares.

El mejoramiento genético del banano originalmente comenzó en Jamaica y Trinidad & Tobago, hace más de 70 años, con el propósito de obtener bananos híbridos resistentes contra el Mal de Panamá a través de programas de mejoramiento clásico o cruzamientos mendelianos (Swennen & Vuylsteke, 1993). Posteriormente, comenzaron a aplicarse como estrategia de lucha contra la Sigatoka en la Fundación Hondureña para la Investigación Agrícola (FHIA), Honduras, hace más de 30 años, y recientemente, otros centros de investigación internacional como el CATIE-Costa Rica (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) e INIBAP-Francia (Instituto Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano) que centraron sus esfuerzos en la obtención de bananos híbridos resistentes a la Sigatoka, además de mejorar la productividad y estabilidad del cultivo. La mayoría de la progenie obtenida son cultivares híbridos tetraploides, los cuales tienen pocas ventajas agronómicas y económicas con relación a los comercialmente utilizados en la actualidad (Vuylsteke & Swennen, 1991). Estos híbridos se han obtenido a través del cruce de cultivares como el Calcuta 4, parental diploide masculino y fuente de resistencia a la enfermedad, con el cultivar Obino L'Ewai y/o el Bobby Tannap, parentales femeninos portadores de los rasgos agronómicos de interés (Vuylsteke & Ortiz, 1995). Los cultivares de banano triploides son altamente estériles, por lo que la mayoría de los esquemas de mejoramiento usan diploides silvestres o mejorados como fuentes de resistencias;

adicionalmente a esto, el tipo de comportamiento varietal de los bananos parentales y cultivares con relación a la enfermedad (susceptible, parcialmente resistente y altamente resistente), depende del espectro de la diversidad genética de ***Mycosphaerella fijiensis***, lo cual amenaza estos programas de mejoramiento al no garantizarse una fuente de resistencia perdurable contra la enfermedad (Stover, 1972).

El mejoramiento clásico tiene como principales desventajas: Lo tedioso de su procedimiento, es una herramienta con resultados a largo plazo, es costosa, además, de los problemas de ploidía del banano, y la baja producción de semillas e infertilidad del polen de la mayoría de los cultivares; se deben enfocar otras estrategias de mejoramiento. Actualmente, los esquemas de mejoramiento están basados en la información de bancos génicos, identificación del perfil genético del banano para que la resistencia deseada en los programas de mejoramiento sea perdurable, realizándose esfuerzos en la búsqueda de genes de resistencia en banano contra la enfermedad (Boscán, 2002), para ello es necesario también entender el rango de diversidad patogénica en las poblaciones del patógeno ***Mycosphaerella fijiensis*** y su capacidad de cambio. Para lograr esto, un conocimiento profundo de la estructura de las poblaciones del hongo es esencial en la obtención de una resistencia durable. En el caso planteado en este trabajo sobre variabilidad genética en el agente causal de la Sigatoka negra (***Mycosphaerella fijiensis***), el estudio debe contar con una estrategia de muestreo adecuada que cubra el “background” genético de ***Mycosphaerella fijiensis***.

A causa de las dificultades expuestas anteriormente, es necesario estudiar la biología del patógeno *Mycosphaerella fijiensis*; para tal efecto, se requiere de técnicas sensibles, específicas y rápidas de biología molecular para llevar a cabo estudios relacionados con:

A.- La identificación molecular del patógeno, ya que el diagnóstico de la Sigatoka negra se complica con la presencia de otros hongos presentes en el banano, que producen síntomas similares a los de la Sigatoka negra o por ser morfológicamente similares (*Mycosphaerella musicola* y *Cordane musae* o *Mycosphaerella musae*, respectivamente); además, los síntomas varían en el grado de expresión, dependiendo del cultivar y del tratamiento fungicida utilizado (Stover, 1969 a, b).

B.- Obtención de información sobre la estructura y variabilidad genética intraespecífica de *Mycosphaerella fijiensis* (Carrier, 1994; Fullerton y Olsen, 1992).

En el presente trabajo, la identificación molecular se llevó a cabo a través de la amplificación de fragmentos de ADN con la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) empleando "primers" específicos para *Mycosphaerella fijiensis* y *Mycosphaerella musicola* desarrollados a partir del ADN ribosómico de ambos hongos (Johanson & Jeger, 1993; Johanson *et.al* 1994; Johanson, 1995), y la técnica utilizada para la determinación de variabilidad genética fue la Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPDs) (Williams *et. al* 1990).

El **RAPD** (ADN polimórfico amplificado al azar), técnica que constituye parte de la tecnología de los marcadores moleculares, presenta en común con los otros marcadores moleculares genómicos la utilización de la reacción en cadena

de la polimerasa "PCR", utilizando oligodeoxinucleótidos sintéticos denominados "primers" (cebadores), cuyas secuencias nucleotídicas son arbitrarias (Williams *et al.* 1990, Welsh & McClelland 1990). Amplifica cualquier región del genoma flanqueada por secuencias complementarias al "primer" y de una longitud adecuada. El número de fragmentos (amplicones) obtenidos durante el evento de amplificación son múltiples y representativos de casi todo el genoma, además están distribuidos arbitrariamente en éste, son independientes de la complejidad y naturaleza del genoma, generalmente de un genoma de secuencia desconocida. EL RAPD se emplea con distintos propósitos, entre ellos para estudiar la variación genética en muchas especies. Esta variación se mide a través de la diversidad genética y relaciones genéticas entre individuos de distintas especies (variabilidad genética interespecífica), y dentro de una misma especie (variabilidad genética intraespecífica). Estas variaciones génicas son conocidas como polimorfismos de las secuencias que flanquean el ADN complementario a los sitios (repeticiones invertidas) de unión al "primer. Estos polimorfismos son el producto del evento de "scanning" del genoma a estudiar. (Caetano-Anollés, 1996-1998), y que pueden ser de distintas naturaleza (inserciones, deleciones, etc.). Se hacen visibles por la presencia o ausencia de una banda (secuencia amplificada correspondiente a un locus determinado del genoma) en una corrida electroforetica, por tanto, el RAPD se trata de un marcador dominante.

Sus ventajas incluye una mayor saturación del genoma al manejarse cebadores universales y, por lo tanto una mejor representación de la variación presente dentro de la especie (Lara, 2003), su bajo coste, y simplicidad técnica.

Entre sus inconvenientes se encuentran su carácter dominante y las dudas de su reproducibilidad (Moreno *et al.* 1997).

HIPÓTESIS

La reciente introducción de la enfermedad Sigatoka Negra en Venezuela, implica poca variabilidad genética en *Mycosphaerella fijiensis*.

OBJETIVOS

GENERAL

I.- Estudiar la variabilidad genética intraespecífica en aislados de *Mycosphaerella fijiensis* provenientes de las regiones de cultivo de banana en la zona Sur del Lago de Maracaibo.

ESPECÍFICOS

I.- Aplicar la técnica de PCR para la identificación molecular de la colección de aislados de *Mycosphaerella fijiensis*.

II.- Utilizar RAPDs para detectar polimorfismo a nivel del ADN genómico en los diferentes aislados de *Mycosphaerella fijiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. MATERIAL BIOLÓGICO (García, 1997-1999)

MATERIAL FUNGICO	CARACTERISTICAS	PROCEDENCIA
<i>Mycosphaerella fijiensis</i> (Morelet)	Aislados patogénicos tomados de hojas de plátanos para la obtención de los cultivos monoascospóricos	Cultivares de plátano Hartón (AAB) del sur del Lago de Maracaibo

Tabla 2. MEDIOS DE CULTIVO (Carlier, 1989-1990)

PRODUCCIÓN EN MASA DE MICELIO DE <i>Mycosphaerella fijiensis</i> (Morelet).	
<u>MEDIO SÓLIDO AGAR-AGUA (3%)</u>	
Agar	3gr.
Agua	100ml
<u>MEDIO LÍQUIDO V8</u>	
Jugo V8	300ml
CaCO ₃	3 g (0,3%)
Agar	15 g.
Agua	700ml.
Estreptomicina	(100ug./ml)
Penicilina	(100UI/ml)
NOTA: Ebulir el medio durante 30 min., centrifugar a 7500 rpm. x 10min., recuperar el sobrenadante y ajustar el volumen a 1 L. A pH 6,0.	

Tabla 3. SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE *Mycosphaerella fijiensis*.

(Graham et al 1994; San Román, 1999)

<u>"BUFFER" DE EXTACCIÓN</u>	<u>VOLUMEN</u>
1M Tris -HCl pH 7,5	10ml.
5M NaCl	28ml
0,50 M EDTA pH 8,0	8ml
CTAB	2g.
Agua destilada	54ml

Cloroformo:Alcohol isoamilico (24:1)
Etanol I 70%, Etanol II 100%

Tabla 4. CONDICIONES DEL PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Mycosphaerella fijiensis*

COMPONENTE	VOLUMEN (ul)	CONCENTRACION FINAL
1.- "Buffer" PCR 10X.	5,00	1X
2.- MgCl ₂ (25mM)	3,0	1,5mM
3.- Mezcla de dNTPs (10mM c/u)	4,0 (1,0 c/u)	0.2mM
4.- "Primer" R635 (1.5 uM)	5,0	2ng/ul
5.- "Primer" MF137/"Primer" MM137	5,0	2ng/ul
6.- Taq DNA polimerasa (4U/ul)	0.5	2U
7.- Agua destilada estéril	22,5	
8.- DNA molde (10 ng/ul)	5.0	25ng/ul

Tabla 5. "PRIMERS" DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR (Johanson 1993, 1994, 1995)

"PRIMER"	SECUENCIA
MF137 (21mer.) MM137 (21mer.) R635 (19mer.)	5 'GGCGCCCCCGGAGGCCGTCTA3' 5 'GCGGCCCCCGGAGGTCTCCTT3' 5 'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'

Tabla 6. PROGRAMA DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *M. fijiensis* (Johanson, 1993, 1994, 1995)

ETAPAS	TEMPERATURA	TIEMPO
I Desnaturalización	94°C	00:03:00
	92°C	00:01:00
	56°C	00:01:30
II Desnaturalización	72°C	00:02:00
"Annealing"	72°C	00:07:00
Extensión		
Ultima Extensión		
30 Ciclos desde la etapa de II Desnaturalización a la etapa de Extensión		

Tabla 7. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LA RAPD- PCR PARA ESTE TRABAJO.

COMPONENTE	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACION FINAL
1.- "Buffer" PCR 10X.	2.5	1X
2.- MgCl ₂ (25mM)	3.0	3mM
3.- Mezcla de dNTPs (10mM c/u)	2.0 (0.5 c/u)	0.2Mm c/u
4.- " Primer" UBC(X) (1.5 uM)	3.3	0.2uM
5.- Taq DNA polimerasa (4U/ul)	0.5	2U
6.- Agua destilada estéril	8.7	
7.- DNA molde (10 ng/ul)	5.0	2ng/ul

Tabla 8. PROGRAMA RAPD-PCR (Johanson, 1994).

ETAPAS	TEMPERATURA	TIEMPO
I Desnaturalización	94°C	00:05:00
	93°C	00:00:30
	36°C	00:00:30
II Desnaturalización	72°C	00:02:00
	72°C	00:10:00
“Annealing”		
Extensión		
Ultima Extensión		
45 Ciclos desde la etapa de II Desnaturalización a la etapa de Extensión		

Tabla 9. GENERALIDADES Y CONDICIONES DE LA ELECTROFORESIS (Sambrook, 1989)

Stock buffer Tris-borato	“Buffer” de carga	Gel Agarosa 1%
5X : 54g Tris base 27.5g ácido bórico 20 ml. 0,5M. EDTA (ph 8.0) Solución de trabajo: 0.5X TBE	Azul de bromo fenol 0,25% Xilencianol 0,25% Sacarosa 10%	Agarosa 2g. “Buffer” TBE 200ml.

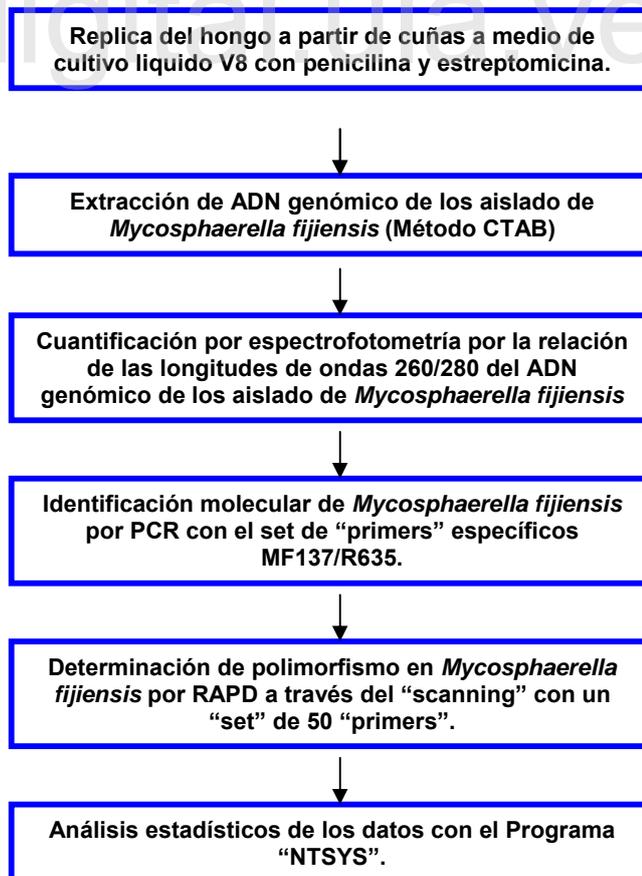
Tabla 10 LISTA DE “PRIMERS” PCR-RAPD (10mers) - The University of British Columbia, Nucleic Acid – Protein Service Unit, UBC RAPD Primer Síntesis Project Oligonucleotide Set

PRIMER N.-	SECUENCIA (5'-3')	% GC
UBC101	GCGGCTGGAG	80
UBC102	GGTGGGACT	70
UBC103	GTGACGCCGC	80
UBC104	GGGCAATGAT	50
UBC105	CTCGGGTGGG	80
UBC106	CGTCTGCCCCG	80
UBC107	CTGTCCCTTT	50
UBC108	GTATTGCCCT	50
UBC109	TGTACGTGAC	50
UBC110	TAGCCCGCTT	60
UBC111	AGTAGACGGG	60
UBC112	GCTTGTGAAC	50
UBC113	ATCCCAAGAG	50
UBC114	TGACCGAGAC	60
UBC115	TTCCGCGGGG	80
UBC116	TACGATGACG	60
UBC117	TTAGCGGTCT	50
UBC118	CCCGTTTTGT	50
UBC119	ATTGGGCGAT	50
UBC120	GAATTTCCCC	50
UBC121	ATACAGGGAG	50
UBC122	GTAGACGAGC	60
UBC123	GTCTTTCAGG	50
UBC124	ACTCGAAGTC	50
UBC125	GCGGTTGAGG	70
UBC126	CTTTCGTGCT	50
UBC127	ATCTGGCAGC	60
UBC128	GCATATCCG	50
UBC129	GCGGTATAGT	50
UBC130	GGTATCCTC	50
UBC131	GAAACAGCGT	50
UBC132	AGGGATCTCC	60
UBC133	GGAAACCTCT	50
UBC134	AACACACGAG	50
UBC135	AAGCTGCGAG	60
UBC136	TACGTCTTGC	50
UBC137	GGTCTCTCCC	70
UBC138	GCTTCCCCTT	60
UBC139	CCCAATCTTC	50
UBC140	GTCGCATTTT	50
UBC141	ATCCTGTTTCG	50
UBC142	ATCTGTTTCGG	50
UBC143	TCGCAGAACG	60
UBC144	AGAGGGTTCT	50
UBC145	TGTCGGTTGC	60
UBC146	ATGTGTTGCG	50
UBC147	GTGCGTCCTC	70
UBC148	TGTCCACCAG	60
UBC149	AGCAGCGTGG	70
UBC150	GAAGGCTCTG	60

METODOLOGÍA GENERAL

Material Biológico.
Obtención del ADN de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .
Biología Molecular (Identificación y determinación de variabilidad génica) en <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .
Análisis estadísticos de los datos.

La metodología seguida en el trabajo:



Material Biológico (*Mycosphaerella fijiensis*).

La colección de aislados monoascospóricos fue cedida por la TSU Yulimar Castro quien trabajó bajo la dirección del Prof. Luís Cedeño (IAAP-ULA), dentro del proyecto Sigatoka defense genes of banana cultivars and wild *Musa* species in Latin America, bajo la responsabilidad de la Dra. María Elena García. Fueron conservados y almacenados según el método sugerido por Castro *et al.* (2002, aceptado para publicación).

Para la recolección de las muestras se usó el método de “Muestreo Jerárquico” (Guzmán, 1998) ya que permite obtener una muestra estadísticamente válida (García *et al.*, 1997-1999).

La tabla 11 indica las zonas donde se realizó el muestreo y la fig 1 muestran la ubicación de la zona geográfica de donde provienen las muestras.

TABLA11 Ubicación geográfica de los sectores A3 y A4 de la finca Hoya Grande (García *et al.*, 1997-1999)

SECTORES HOYA GRANDE	ZONAS MUESTREADAS
A3 A4	Caño muerto-concha Sta. Rosa-El Chivo

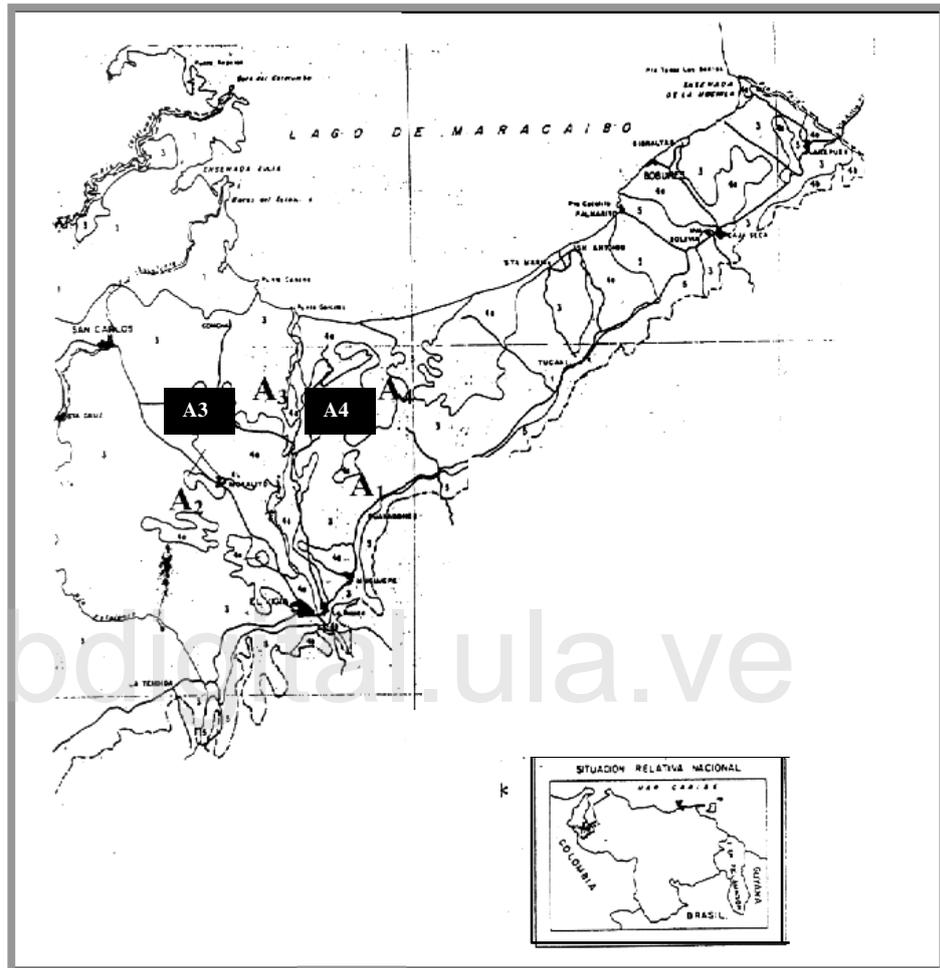


Fig 1. Ubicación geográfica de los sectores A3 y A4 en la zona Hoya Grande,
(García *et al.*, 1997-1999)

El muestreo jerárquico consta de cinco niveles, y cada nivel esta conformado por la obtención de cuatro aislados monoascospóricos de *Mycosphaerella fijiensis*, organizados de la siguiente forma:

Nivel I: Variabilidad de aislados de la zona de estudio. Corresponde al material foliar de cuatro plantas elegidas al azar en la parcela de estudio. Se toman las

hojas más infectadas de las cuatro plantas previamente elegidas, para realizar cultivos monoascospóricos.

Nivel II: Variabilidad de aislados provenientes de cuatro plantas elegidas como aquellas que están alrededor de la planta mas infectada de la parcela de estudio.

Nivel II: Variabilidad entre aislados procedentes de cuatro hojas con síntomas de Sigatoka negra de la planta escogida como centro de recolección para las cuatro plantas que constituyen el nivel II.

Nivel IV: Variabilidad de aislados procedentes de diferentes lesiones de una hoja escogida al azar de la planta que forma parte del Nivel III.

Nivel V: Variabilidad de aislados provenientes de diferentes puntos de una lesión tomada de una hoja de la planta del Nivel III.

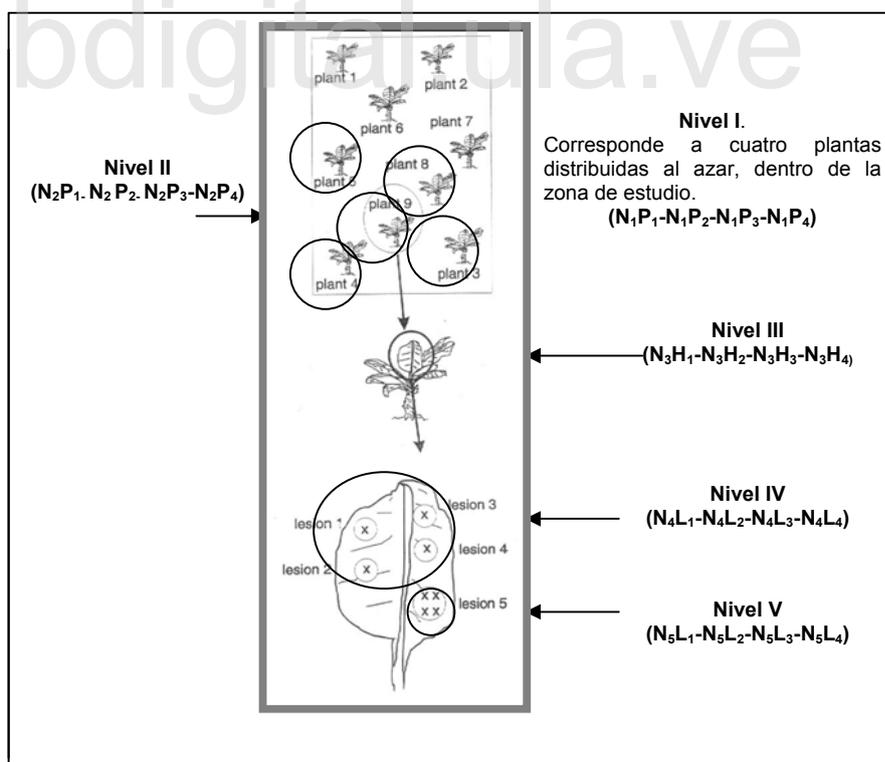


Fig 2. Esquema del muestreo jerárquico (Guzmán *et al.*, 1998).

Réplica de micelio en medio líquido V8 a partir de cuña.

El medio de crecimiento fúngico universal más utilizado en los estudios de biología molecular llevados a cabo en *Mycosphaerella fijiensis* es el medio líquido V8 (Carlier, 1989-1990).

A partir de los aislados de *M. fijiensis* de la colección, se realizaron las siembras en medio líquido V8 con penicilina y estreptomina, con el fin de obtener aproximadamente 1 g. de micelio seco para la etapa de extracción de ADN.

Extracción de ADN genómico de los aislados de *Mycosphaerella fijiensis*.

La fuente primaria para llevar a cabo las etapas de amplificaciones es el ADN de *M. fijiensis*, para tal fin se realizaron las extracciones de ADN empleando una modificación del método CTAB originalmente para hongos (Graham *et al.*, 1994; Lloy-Malgilp, 1996) y modificado por San Román (1999). Las optimizaciones de las reacciones de la PCR-RAPD ([MgCl₂], [dNTP], [ADN], [Tag.]) se realizó bajo la asesoría del Lic. Armando Briceño.

El método CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) el fundamento es similar al método de "Salting out", pero en vez de usar el "buffer" que contiene a la proteinasa K, que destruye a las membranas nucleares, liberando a la solución los ácidos nucleicos, se usa una solución de homogeneización (CTAB sal de amonio cuaternario con propiedades detergentes, NaCl, EDTA, Tris-HCl ph 7,5). Otro método complementario en las extracciones de ADN es el método con fenol neutralizado (con "buffer" TE, ph 7.5), es una técnica muy común usada para purificar muestras de ADN, al disolver proteínas, además de ser el método

estándar para la remoción de proteínas de las preparaciones que contienen ácidos nucleicos. La precipitación de las muestras es llevada a cabo por incubación a -20 °C, toda la noche con etano, siguiendo el siguiente protocolo.

Procedimiento de extracción, purificación y concentración del ADN *M.fijiensis*.

- 1.- Pesar apox. 1g. micelio.
- 2.- Pulverizar el micelio en N₂ líquido
- 3.- Incubar en 500 µl de “buffer” CTAB x 20min.a 55°C.
- 4.- Centrifugar a 7500 rpm x 20min.
- 5.- Recuperar el sobrenadante, agregar Cloroformo- Alcohol isoamilico (24:1), mezclar suavemente x 2min.
- 6.- Centrifugar a 7500 rpm.
- 7.- Recuperar fase acuosa superior y repetir pasos 5 -6.
- 8.- Precipitar ADN con un volumen igual de etanol puro.
- 9.-. Incubar durante toda la noche, centrifugar al día siguiente.
- 10.- Disolver en 500 µl de “buffer” TBE, e incubar con RNAsa (10 µl; 0,2 mg/ml) a 37°C x 1h.
- 11.- Extraer con fenol (500ul), agitar por inversión, centrifugar a 7500 rpm.
- 12.- Lavar con etanol al 70 % dos veces, dejar secar.
- 13.- Resuspender el “pellet” en 200ul de agua o “buffer” TBE, y cuantificar ADN.

Cuantificación del ADN

La pureza y concentración del ADN obtenido se evalúa por la relación de las lecturas espectrofotométricas a dos longitudes de ondas: UV 260 y 280 nm., debido a que las bases púricas y pirimídicas absorben a 260nm. , y las proteínas a 280nm (Sambrook, 1989).

Debido a la no uniformidad en la cantidad de micelio, material fúngico para la extracción de ADN, las cuantificaciones de éste no son iguales, por lo tanto las concentraciones se estandarizaron por dilución para obtener la más apropiada para trabajar, ya que este parámetro es el más importante tanto para la PCR como

para la PCR-RAPD, además de descartar aquellas extracciones que reflejen contaminación del ADN y bajo rendimiento.

Identificación molecular de *Mycosphaerella fijiensis* con la técnica de PCR.

Para el caso de la Sigatoka, se han desarrollado “primers” específicos para el diagnóstico de la Sigatoka negra y amarilla, a partir del ADN ribosómico, a saber (MF137-R635) y (MM137-R635) para *M. fijiensis* y *M. musicola*, respectivamente (Johanson & Jeger, 1993).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR “polymerase chain reaction”), desarrollada en la década de los 80 por Kary Mullis, permite producir múltiples copias de un fragmento específico de ADN (Innis M., Gelfand D., 1990).

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos:

- 1.- Desnaturalización del ADN doble banda a altas temperaturas (94°C) en las dos cadenas que lo forman y que se quiere amplificar.
- 2.- “Annealing” o unión de los cebadores o “primers” a una región específica de las cadenas, y
- 3.- Extensión de la cadena de ADN de interés originalmente complementaria al fragmento de ADN inicialmente separado en el paso de desnaturalización.

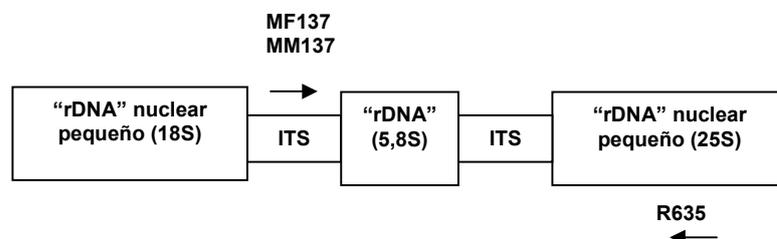


Fig 3. Localización de los “primers” de PCR en el ADN ribosomal fúngico.

Con la disponibilidad de estos dos pares de “primers” se llevó a cabo la respectiva identificación molecular de *M. fijiensis*, con un control positivo (cepa certificada de *M.fijiensis*) y un control negativo (cepa certificada de *M.musicola*). Esta identificación molecular en nuestro estudio será el segundo criterio de seguridad del material biológico de trabajo, además de ser el más importante. La longitud del fragmento amplificable a obtener para ambos casos es de 1Kb.

Determinación de polimorfismo en el ADN genómico de cada aislado de *Mycosphaerella fijiensis*.

En los estudios de determinación de polimorfismos con PCR-RAPD propuestos en este trabajo, se realizaron estandarizaciones de las concentraciones de los parámetros (ADN, dNTPs, Tag. Polimerasa y MgCl₂) , como etapas de optimización de las reacciones, luego se realizó un sondeo inicial con todos los “primers” para determinar cuales de ellos daban productos de amplificación y más de un producto de amplificación de la reacción, descartándose aquellos que no amplificaban nada, así como los que daban sólo una banda como producto de amplificación. Para tal fin, se contó con un “set” de 50 “primers” (10mers), desarrollados en la Universidad de la Columbia Británica, con un contenido de guanina–citosina que va de 50-60-70-80 %. Posteriormente, se llevó a cabo las reacciones de PCR-RAPD con los “primers” determinados en la etapa previa.

Electroforesis en geles de agarosa.

Los resultados de la amplificación para cada “primer” se visualizaron en electroforesis en geles de agarosa (1%) para determinar el patrón de corrida de las bandas de ADN del muestreo jerárquico de *Mycosphaerella fijiensis*. El tamaño de las bandas se determinó con el marcador de peso molecular de una 1kb. La corrida se realizó por un tiempo de 3 horas (Marcano, 1999 com. pers.), al final del cual se visualizó el gel de agarosa con tinción de bromuro de etidio (1ml. bromuro de etidó) en un tras-iluminador. El registro del patrón electroforético se hizo mediante impresión fotográfica del gel.

Análisis de los datos.

Para esta parte del trabajo se contó con el asesoramiento del Dr. Mario Fariña del Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas (ICAE), el Dr. Javier Estrada del Jardín Botánico y la Ing. Agr. María Marcano del Laboratorio de Genética y Química Celular (GeQuimCel).

La información molecular del perfil electroforético de la PCR-RAPD para cada uno de los “primers” utilizados para cada zona de muestreo (Hoya Grande), se analizó con el fin de distinguir el grupo de “primers” monomórfico de los polimórficos, mediante la observación visual y medición (Anexo p. 96-103) de las bandas representadas en cada gel. El polimorfismo se hace evidente en aquellos aislados que tienen mutaciones puntuales (inserción, delección, etc.) en los sitios de apareamiento del par ADN molde/“primer” y que, por lo tanto, no muestran producto de amplificación en el gel. Como “primers” monomórficos se identificaron

aquellos cuyas bandas coemigran a la misma distancia medida desde el pozo del gel donde se carga la muestra de ADN hasta el punto del frente electroforético para esa banda, y para la cual no se determina ausencia de esa banda en ninguno de los veinte aislados de *Mycosphaerella fijiensis* del muestreo. Por el contrario, se identificaron como “primers” polimórficos aquellos donde se detecta la presencia/ausencia de una banda determinada que coemigra para el conjunto (muestreo).

Posteriormente, el análisis estadístico de los datos generados para aquellos patrones electroforéticos polimórficos se realizó con el paquete de programas filogenético NTSYS (Rohlf, 1990) (Anexo p. 104) por “primer”, por conjunto de “primers” para cada zona de estudio, y para el conjunto de “primers” comunes para las dos zonas de estudio.

El muestreo Hoya Grande Zona Húmeda y Zona Seca se evaluó con los “primers” UBC: 115-125-135-149; los demás “primers” polimórficos para ambos muestreos no se consideraron, por ausencias de amplificación en algunas de los aislados del conjunto (HGZH ó HGZS) o por no amplificación del “primer” en uno de los muestreo en particular; y poder comparar los análisis individuales por zona, con los correspondientes al total del conjunto Hoya Grande.

Para cada “primer” polimórfico, la presencia/ausencia de una banda de RAPD se cuantificó mediante el registro con el valor 1 o valor 0, respectivamente en una matriz básica de datos (banda “RAPD” se refiere a un “set” de fragmentos que coemigran de RAPD amplificados para el mismo “primer”, para un “set” de genotipos del conjunto; en estudios de variabilidad genética intraespecífica a nivel

de especie no es necesario verificar la homología de estas bandas, por lo que se asume que los fragmentos no representan diferentes secuencias de ADN). En la matriz básica de datos, las bandas RAPD por “primer” se distribuyeron ocupando la primera columna, y los aislados del muestreo jerárquico en la primera fila (Anexo pág 87-88); se construyeron matrices básicas de datos de RAPD por “primer” por muestreo jerárquico, matrices básicas combinando todos los polimorfismos detectados para el conjunto de “primers” de un muestreo jerárquico, y para el conjunto de “primers” en común para ambos muestreos jerárquicos.

Las relaciones genéticas se estimaron, para cada caso mencionado arriba, a través del uso de un número de análisis estadísticos y gráficos, teniendo como premisa el siguiente criterio: La afinidad o grado de similitud entre los grupos se establece al mayor o menor número de caracteres en común (relación fenética), como lo establece De La Sota en el año de 1967 (Marín, 2003); es decir, que cada objeto del grupo que es un aislado de *Mycosphaerella fijiensis* puede diferir en cierta medida respecto al valor 1 ó 0 de una variable similar (caracteres = banda “RAPD”) en otro objeto del grupo, que es otro aislado de *Mycosphaerella fijiensis*, estableciéndose “clusters” según las relaciones fenéticas calculadas. Debido a ciertas dudas con respecto a la determinación de la presencia o ausencia de ciertas bandas, se construyeron matrices binarias para ambos casos donde se considera la banda y donde no se toma en cuenta; considerándose por separado para los respectivos análisis.

Los análisis estadísticos y gráficos para determinar el grado de similaridad para cada matriz básica construida, comprendieron el coeficiente o índice de

similitud de Dice, propuesto en el año de 1945 [$2a/(2a+b+c)$], el cual le da doble peso a las bandas presentes en ambas muestras y no contabiliza los casos en los que las bandas están ausentes en ambas muestras, y el coeficiente o índice de similitud de Jaccard, establecido en el año de 1908, para datos cualitativos de presencia/ausencia. Este índice está diseñado para ser igual a 1 en casos de similitud completa e igual a 0 en comunidades sin especies en común. Sin embargo, este índice ($a/(n-d)$) no considera abundancia de especie, de forma que todas las especies tienen igual peso en la ecuación con independencia de su mayor o menor abundancia y los análisis gráficos se realizaron con el método UPGMA (Marín, 2003).

Con estos índices se obtuvieron las matrices de similitud, que son tablas de distancias o grados de asociación entre puntos (aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis*), y con los gráficos se obtuvieron los dendogramas y el árbol consenso para cada índice empleado (Anexo p. 108-120). La consistencia de los dendogramas o fenogramas se evaluaron a través de la determinación del valor de correlación entre la matriz de los valores cofenéticos de los datos de similitud con la matriz de similitud de Dice y Jaccard, escogiéndose aquellos dendogramas o fenogramas con un valor igual a uno o próximos a este (Resultados y Discusión p. 60-71). La interpretación del número de “clusters” de los dendogramas se realizó cualitativamente.

Los árboles consenso obtenidos con el programa Consensos miden el grado de acuerdo de la estructura topológica de los dendogramas establecidos; se determinaron para cada índice de similitud. Por derivar de un solo dendograma

para cada índice de medición de similitud, su interpretación no se consideró en la sección de discusión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Originalmente se había decidido emplear 1g. de peso seco (según protocolo) de micelio para realizar las extracciones de ADN, pero debido a la dificultad en el procedimiento de pesado, además de problemas de crecimiento del hongo para alguno de los aislados en el medio V8, se obtuvieron valores de peso seco de micelio que fluctuaron desde 0,8 a 1,1g; a partir de los cuales se procedió a realizar las extracciones.

Las concentraciones de ADN de los aislados de *Mycosphaerella fijiensis* del muestreo jerárquico Hoya Grande se cuantificaron, registrándose los siguientes valores (Tabla 12 y 13).

TABLA 12. Valores de concentración de ADN *Mycosphaerella fijiensis* sector Hoya Grande Zona Húmeda (HGZH).

MUESTRA ADN	D.O. 260	D.O. 280	ug./ml	ng./ul	ng./ul x 200
<i>HGZH</i>					
N ₁ P ₁	0,037	0,023	1,9	1,9	380
N ₁ P ₂	0,041	0,023	2,0	2,0	400
N ₁ P ₃	0,052	0,022	2,6	2,6	520
N ₁ P ₄	0,089	0,045	4,5	4,5	900
N ₂ P ₁	0,040	0,018	2,0	2,0	400
N ₂ P ₂	0,026	0,009	1,3	1,3	260
N ₂ P ₃	0,029	0,013	1,4	1,4	280
N ₂ P ₄	0,080	0,034	4,0	4,0	800
N ₃ H ₁	0,023	0,008	1,1	1,1	220
N ₃ H ₂	0,002	0,001	0,1	0,1	20
N ₃ H ₃	0,054	0,027	2,7	2,7	540
N ₃ H ₄	0,152	0,086	7,6	7,6	1520
N ₄ L ₁	0,044	0,012	2,2	2,2	440
N ₄ L ₂	0,147	0,062	7,3	7,3	1460
N ₄ L ₃	0,020	0,004	1,0	1,0	200
N ₄ L ₄	0,093	0,004	4,7	4,7	940
N ₅ L ₁	0,040	0,024	2,0	2,0	400
N ₅ L ₂	0,017	0,002	0,9	0,9	180
N ₅ L ₃	0,012	0,006	0,6	0,6	120
N ₅ L ₄	0,122	0,047	6,1	6,1	1220
N ₅ L ₄	0,154	0,080	7,7	7,7	1540

TABLA 13. Valores de concentración de ADN de *Mycosphaerella fijiensis* sector Hoya Grande Zona Seca (HGZS).

MUESTRA ADN	D.O. 260	D.O. 280	ug./ml	ng./ul	ng./ul x 200
<i>HGZS</i>					
N ₁ P ₁	0,133	0,060	6,7	6,7	1340
N ₁ P ₂	0,015	0,011	0,8	0,8	160
N ₁ P ₃	0,030	0,014	1,5	1,5	300
N ₁ P ₄	0,081	0,038	4,1	4,1	820
N ₂ P ₁	0,037	0,015	1,9	1,9	380
N ₂ P ₂	0,020	0,008	1,0	1,0	200
N ₂ P ₃	0,119	0,106	6,0	6,0	1200
N ₂ P ₄	0,030	0,008	1,5	1,5	300
N ₃ H ₁	0,007	0,003	0,4	0,4	80
N ₃ H ₂	0,038	0,017	1,9	1,9	380
N ₃ H ₃	0,065	0,023	3,3	3,3	660
N ₃ H ₄	0,050	0,019	2,5	2,5	500
N ₄ L ₁	0,021	0,003	1,0	1,0	200
N ₄ L ₂	0,051	0,014	2,5	2,5	500
N ₄ L ₃	0,002	0,002	0,1	0,1	20
N ₄ L ₄	0,007	0,000	0,4	0,4	80
N ₅ L ₁	0,004	0,009	0,2	0,2	40
N ₅ L ₂	0,011	0,002	0,6	0,6	120
N ₅ L ₃	0,040	0,009	2,0	2,0	400
N ₅ L ₄	0,040	0,009	2,0	2,0	400

Los valores de concentración de ADN para los aislados de Hoya Grande Zona Húmeda van desde 1540 a 20 ng/ul y para Hoya Grande Zona Seca van desde 1340 a 20 ng/ul.

Para la identificación molecular por PCR, el ADN de los aislados para cada muestreo se amplificó con los “primers” MF137/R635. Las reacciones de amplificación de los controles positivo y negativo (cepas certificadas de *M.fijiensis* y *musicola*) no se efectuaron por pérdida de este material, se incluyó el control que consiste en la mezcla de reacción sin ADN. La amplificación de los aislados de *M.fijiensis* para ambos muestreos produjo un producto de PCR de aproximadamente 1000bp. (Fig 4,5, y 6) (Anexo p.81), determinación que concuerda con la

especificidad de los “primers” empleados y el tamaño del producto a amplificar (Johanson y Jeger, 1994). No se observó amplificación en la mezcla de reacción que no contenía ADN.

La estandarización realizada para optimizar la PCR-RAPD con el parámetro concentración de ADN, empleando cuatro concentraciones diferentes (25-50-100-150 ng), resultó en amplificaciones que no se diferenciaron marcadamente ni en la intensidad ni en el patrón de bandeo (Fig.7) (Anexo p. 82), y se eligió el valor de 50 ng/ μ l como concentración “stock” de trabajo. Esta concentración se seleccionó con el criterio de no desperdiciar material genómico al utilizar las concentraciones de 100-150 ng/ μ l, que son altas e innecesarias, y de evitar usar la baja concentración de 25ng/ μ l que pudiera ser insuficiente para las posteriores reacciones de estandarizaciones de los parámetros: Taq. polimerasa, concentración de MgCl, concentración de dNTPs y de la PCR-RAPD. El ADN de cada aislado del muestreo jerárquico se diluyó a 50ng/ μ l de concentración de ADN, excepto para aquellos casos cuya cantidad de ADN cuantificado fue inferior a este valor.

Para la optimización de la concentración de dNTPs, se observó igual patrón de bandeo a ambas concentraciones de 100 y 200 μ M (Fig.8) (Anexo p. 82), estandarizándose a la concentración de 100 μ M.

Los resultados observados para la estandarización de la Taq. polimerasa fueron ligeramente diferentes en cuanto al número de bandas (Fig 9) (Anexo p. 83). El patrón de bandeo fue más claro y

definido a 1U que a 2U de Taq. polimerasa, y se estableció 1U de Taq como unidad de trabajo, para no comprometer la resolución de los RAPDs a costa de no tener un mayor bandeo como el observado a 2U de Taq. polimerasa.

La estandarización de la concentración de MgCl permitió elegir el valor de 3 μ M, por presentar mejor patrón y resolución de bandeo.

Estandarizados los parámetros más importantes de la PCR-RAPD, se evaluó el "set" de 50 "primers" (Tabla 14) con el ADN de uno de los aislados del muestreo jerárquico Hoya Grande Zona Húmeda, seleccionando aquellos que generaron productos de PCR-RAPD informativos (patrón de bandeo monopolimórfico); obteniéndose resultados para diecisiete "primers". Los restantes "primers" (treinta y tres) no dieron producto de reacción o amplificaron una sola banda que no indicó ningún tipo de patrón de bandeo (Fig.10) (Anexo p. 83).

Los “primers” que generaron patrón de bandeo pertenecían a los cuatro grupos de distinto de

PRIMER UBC	SECUENCIA (5'-3')	%GC
------------	-------------------	-----

 “primers” con porcentaje de guanina y citosina (G-C), seis “primers” con cincuenta por ciento, cinco con ochenta por ciento, cuatro con sesenta por ciento y dos con un contenido de setenta por ciento de guanina-citosina.

Estas observaciones no concuerdan con lo publicado en la mayoría de los trabajos con PCR-RAPD, que establecen que la generación de patrón de bandeo con respecto al contenido guanina-citosina tiene una relación proporcional, los “primers” con mayor contenido de (G-C) son los que producen más amplificaciones (San Román, 1999).

bdigital.ula.ve

TABLA 14. Secuencia y porcentaje de Guanina-Citosina para el conjunto de “primers” con patrón de bandeo.

101	GCGGCTGGAG	80
103	GTGACGCCGC	80
104	GGGCAATGAT	50
105	CTCGGGTGGG	80
106	CGTCTGCCCG	80
108	GTATTGCCCT	50
115	TTCCGCGGGG	80
116	TACGATGACG	60
117	TTAGCGGTCT	50
119	ATTGGGCGAT	50
126	CTTTCGTGCT	50
127	ATCTGGCAGC	60
129	GCGGTATAGT	50
135	AAGCTGCGAG	60
137	GGTCTCTCCC	70
138	GCTTCCCCTT	60
149	AGCAGCGTGG	70

Las reacciones RAPD de los “primers” informativos dieron un resultado de amplificación diferente para cada muestreo, teniendo en común sólo los “primers” UBC: 104-105-108-111-115-125-127-135-138-149; los demás “primers” amplificaron sólo para un muestreo (Tabla 15).

Los “primers” UBC: 103-104-138 produjeron un patrón de bandeo monomórfico para el muestreo jerárquico Hoya Grande Zona Seca, y el UBC138 fue monomórfico para el muestreo Hoya Grande Zona Húmeda. Los “primers” UBC: 105-106-108-111-115-116-125-127-135-149 resultaron polimórficos para Hoya Grande Zona Seca y los “primers” UBC: 104-105-108-111-115-117-119-125-127-129-135-137-149 fueron polimórficos para Hoya Grande Zona Húmeda (Tabla 16).

TABLA 15. Amplificación empleando un conjunto de “primers” para ambos muestreos (+) =amplificó, (-) = no amplificó.

“PRIMER” UBC	Hoya Grande Zona Húmeda	Hoya Grande Zona Seca
-----------------	----------------------------	--------------------------

103	-	+
104	+	+
105	+	+
106	-	+
108	+	+
111	+	+
115	+	+
116	-	+
117	+	-
119	+	-
125	+	+
127	+	+
129	+	-
135	+	+
137	+	-
138	+	+
149	+	+

Doscientas veintes bandas (monomórficas + polimórficas) cuantificables (“scored”) se generaron por RAPDs, en conjunto para ambas zonas de muestreo (Hoya Grande Zona Húmeda y Seca), de las cuales ciento treinta y seis correspondieron al muestreo Hoya Grande Zona Húmeda y ochenta y cuatro al muestreo Hoya Grande Zona Seca. Se obtuvieron ciento treinta y un bandas polimórficas cuantificables para el muestreo Hoya Grande Zona Húmeda, y cincuenta y cinco bandas polimórficas para el muestreo Hoya Grande Zona Seca.

El perfil electroforético de la PCR-RAPD arrojó las bandas con pesos moleculares diversos, estimados visualmente en todo el rango de la escalera λ con peso molecular de 1Kb., los máximos valores se ubicaron entre 10000-250 pb., determinados con el “primer” UBC149, para el muestreo Hoya Grande Zona Húmeda. Las bandas se distribuyeron frecuentemente entre los valores de 4000 y 250 bp para el conjunto de “primers” de este muestreo. Para el muestreo Hoya Grande Zona Seca, los máximos valores se ubicaron entre 5000-250 bp, determinados con el “primer” UBC105; con valores frecuentes ubicados entre

2500-500 bp. , para el conjunto de “primers” empleados con el muestreo correspondiente a esta zona.

TABLA 16. Patrón de bandeo Monomórfico (M) y polimórfico (P) para el conjunto de “primers” para ambos muestreos. (-) no amplificó.

“PRIMER”	Hoya Grande Zona Húmeda	Hoya Grande Zona Seca
103	-	M
104	P	M
105	P	P
106	-	P
108	P	P
111	P	P
115	P	P
116	-	P
117	P	-
119	P	-
125	P	P
127	P	P
129	P	-
135	P	P
137	P	-
138	M	M
149	P	P

El perfil electroforético para cada “primer” se presenta en las Figs 11-34 (Anexo p. 84-95).

Las matrices de similitud que corresponden a los análisis individuales por “primer” y por zona de muestreo, obtenidas con el índice de Jaccard (Anexo p. 108-113), presentaron los resultados incluidos en la tabla 17.

Para ambas zonas analizadas por separado con el “primer” UBC115, la matriz de similitud dio valores que no son de interpretación fácil, considerándose estos resultados como un artefacto.

Con el “primer” UBC125, los valores de similitud para el muestreo Hoya Grande Zona Húmeda se ubicaron entre un valor mínimo de 0,905 y un máximo de 1,000. En el dendograma que representa la topología para este “primer” se

diferenciaron dos “clusters”, uno de los cuales forma el grupo más grande con dieciocho representantes del muestreo y cuya similitud entre todos ellos es de 1,000; el otro “cluster” está constituido por dos miembros, correspondientes a los aislados **N₁P₁** (código 1) y **N₅L₁** (Código 17), cuyas similitudes se ubicaron en el orden de 0,950 y 0,905 respectivamente, con relación al resto de los aislados.

Para el caso del muestreo jerárquico Hoya Grande Zona Seca, la topología del dendograma estableció tres “clusters”; sólo diez aislados, a saber: **N₁P₁-N₃H₁-N₃H₂** (códigos 1-9-10), **N₁P₃-N₃H₃** (códigos 3-11), **N₁P₄-N₂P₁**, (códigos 4-5) y **N₅L₁-N₅L₃-N₅L₄** (códigos 17-19-20), presentaron una similitud de 1,000. Estos aislados se ubicaron en los tres agrupamientos establecidos. Las matrices de similitud presentaron como valor mínimo 0,563 entre los aislados **N₂P₂** y **N₄L₃** (código 6 y 15) y un máximo de 1,000.

Para el muestreo HGZH con el “primer” UBC135, los valores de similitud fluctuaron entre un valor mínimo de 0,857 y un máximo de 1,000; este “primer” estableció dos grupos, uno constituido por dos aislados **N₂P₄-N₅L₄** (código 8-20) y el otro por el resto del conjunto del muestreo, y cuya similitud dentro del grupo fue de 1,000. Para el mismo “primer”, pero con el muestreo HGZS, la estructura del dendograma presentó dos “clusters”, el grupo más pequeño está establecido con el aislado **N₄L₂** (código 15) y el otro con el resto de los aislados el cual está subdividido, a su vez, en dos subgrupos, uno representado con el aislado **N₃H₂** (código 10) y el otro por el resto de los aislados. Los valores de similitud van desde un valor mínimo de 0,667 a 1,000.

La matriz de similitud para HGZH, analizada con el “primer” UBC149, presentó valores desde 0,600 para el par **N₅L₃- N₁P₁** (código 17-1) y un valor

máximo de similitud de 1,000 para los siguientes agrupamientos: $N_1P_3-N_2P_1-N_2P_3-N_2P_4-N_3H_1-N_5L_2$ (códigos 3-5-7-8-9-18). El dendograma estableció tres “clusters”; en uno de ellos se agrupan los dos subgrupos con el mayor índice de similitud. En el caso del muestreo HGZS, la topología del dendograma fue sencilla, representada por dos “clusters”, sus miembros se agruparon entre si con la similitud máxima de 1,000 y un valor mínimo de similaridad de 0,900.

Tabla 17. Valor máximo y mínimo de similitud con el índice de Jaccard y número de “clusters” en el dendograma para los “primers” analizados para cada zona de muestreo.

INDICE	“PRIMER”	HGZH		HGZS	
		Valores de similitud (Máx-Min.)	Número de “clusters”	Valores de similitud (Máx-Min.)	Número de “clusters”
Jaccard	UBC125	1,000-0,905	2	1,000-0,563	3
	UBC135	1,000-0,857	2	1,000-0,667	2
	UBC149	1,000-0,600	3	1,000-0,900	2

Los valores de similitud y el número de “clusters” en el dendograma, con los índices de Dice y Jaccard, para el conjunto de “primers” analizados y para cada zona de muestreo, se presentan en la tabla 18.

Con el índice de Dice para los “primers” UBC125-135-149, en el muestreo Hoya Grande Zona Húmeda, los valores de similitud fluctuaron entre un valor mínimo de 0,861 y un máximo de 1,000. Los aislados $N_2P_1-N_2P_3$ (código 5-7), $N_3H_3-N_4L_3-N_4L_4-N_5L_3$ (código 11-15-16-19), $N_4L_1-N_4L_2$ (código 13-14) son los que poseen el máximo de similitud. Para el índice de Jaccard con los mismos “primers”, la matriz de similitud fue idéntica en cuanto a los aislamientos que agrupa el índice de Dice, pero con valores de asociación totalmente diferentes, que fluctuaron desde un mínimo de 0,756 y un máximo de 1,000. La estructura

topológica del dendograma con ambos índices fue la misma y está representada por dos “clusters”, el más grande posee una estructura agrupacional concatenada (Dendograma p. 66-67).

Con el índice de Dice para el muestreo Hoya Grande Zona Seca, con los “primers” UBC:125-135-149, se observó un valor de similitud mínimo de 0,780, entre los aislados **N₂P₂-N₄L₃** (código 6-15), y un máximo de 1,000, observado sólo para los aislados **N₃H₁-N₃H₂** (código 9-10) y **N₅L₃-N₅L₄** (código 19-20). El dendograma para el índice de Dice estableció dos grandes “clusters”. Los resultados obtenidos con los mismos “primers”, con el índice de Jaccard, van desde un valor mínimo de similitud de 0,639 para el par de aislados **N₂P₂-N₄L₃** (código 6-15) y un máximo de 1,000 para **N₅L₃-N₅L₄** (código 19-20). La topología del dendograma y el número de “clusters” fue igual al establecido en el índice de Dice (Dendograma p.68-69).

Tabla 18. Valor máximo y mínimo de similitud con los índices de Dice y Jaccard, y número de “clusters” en el dendograma para el conjunto de “primers” analizados en común para cada zona de muestreo.

Zona de muestreo	“PRIMER”	INDICE	Valores de similitud (Máx-Mín)	Número de “cluster”
HGZH	UBC115 UBC125 UBC135 UBC149	Dice	1,000-0,861	2
		Jaccard	1,000-0,756	2
HGZS	UBC115 UBC125 UBC135 UBC149	Dice	1,000-0,780	2
		Jaccard	1,000-0,639	2

Finalmente, la estructura agrupacional del dendograma, (Dendograma p.70-71) considerando los “primers” UBC: 125-135-149 polimórficos y común para ambas zonas, resultó similar con ambos índices (Dice y Jaccard), diferenciándose dos “clusters” que agruparon de forma separada los veinte miembros de un muestreo (HGZH) y los otros veinte miembros del otro muestreo (HGZS). En la matriz de similitud de Dice para los mismos “primers”, el grupo de aislados **N₁P₂-N₃H₂** (código 2-10), **N₃H₃-N₄L₃-N₄L₄** (código 11-15-16), **N₄L₁-N₄L₂** (código 13-14) y **N₁P₃-N₂P₁** (código 3-5) del muestreo Hoya Grande zona húmeda, son los que poseen el máximo de similitud. Dentro del “cluster” que agrupa a los aislados de HGZH se observa que los aislados **N₁P₁** (código 1) y **N₅L₁** (código 17) están separados del resto. En el “cluster” que agrupa a los aislados de HGZS, se determina que los aislados **N₃H₁-N₃H₂** (código 29-30), **N₁P₄-N₂P₁** (código 24-25) y **N₅L₃-N₅L₄** (código 39-40) son los que poseen un valor de similitud de 1,000.

En forma general (Tabla 19), para el muestro constituido por los cuarenta aislados, se observaron valores que fluctuaron desde un valor mínimo de 0,627 para **HGZHN₅L₁** (código 20) y **HGZSN₄L₃** (código 35); el valor máximo de 1,000 lo registraron los aislados del muestreo Hoya Grande Zona Húmeda **HGZHN₂P₁-HGZHN₃H₂** (código 2-10), **HGZHN₁P₃-HGZHN₂P₁-HGZHN₂P₃** (código 3-5-7), **HGZHN₃H₃-HGZHN₄L₃-HGZHN₄L₄-HGZHN₅L₃** (código 11-15-16-19) y **HGZHN₄L₁-HGZHN₄L₂** (código 13-14); y los aislados del muestreo Hoya Grande Zona Seca **HGZSN₃H₁-HGZSN₃H₂** (código 29-30), **HGZSN₁P₄-HGZSN₂P₁** (código 24-25) y **HGZSN₅L₃-HGZSN₅L₄** (código 39-40). Los valores de similitud con el índice de Jaccard van desde un valor mínimo de 0.457 para los aislados **HGZHN₅L₁** (código

20) y **HGZSN₄L₃** (código 35); el valor máximo de 1,000 lo registraron los aislados del muestreo Hoya Grande Zona Húmeda **HGZHN₂P₁-HGZHN₃H₂** (código 2-10), **HGZHN₁P₃-HGZHN₂P₁-HGZHN₂P₃** (código 3-5-7), **HGZHN₃H₃-HGZHN₄L₃-HGZHN₄L₄-HGZHN₅L₃** (código 11-15-16-19) y **HGZHN₄L₁-HGZHN₄L₂** (código 13-14); y los aislados del muestreo Hoya Grande Zona Seca **HGZSN₃H₁-HGZSN₃H₂** (código 29-30), **HGZSN₁P₄-HGZSN₂P₁** (código 24-25), y (**HGZSN₅L₃-HGZSN₅L₄**, (código 39-40).

El árbol Consenso para cada caso planteado en las matrices básicas deriva de un solo dendograma, por lo que su topología fue igual a la de ellos. Las variantes sólo se dieron en cuanto al grado de acuerdo/desacuerdo de los grupos establecidos en los dendogramas. De forma general, el árbol consenso considerado fue el de ambos muestreos. Con el índice de Dice, el árbol consenso agrupó a los siguientes aislamientos como los de mayor acuerdo, a saber: **N₅L₁HGZH-N₅L₅HGZH**, **N₄L₂HGZS-N₄L₃HGZS-N₄L₄HGZS** (códigos 17-20,34-35-36), respectivamente. Con el índice de Jaccard, se establecieron los mismos grupos anteriores, y el árbol consenso para ambos índices a la vez (Dice-Jaccard) agrupan los aislados **N₂P₄HGZH-N₅L₁HGZH**, y **N₄L₂HGZS-N₄L₃HGZS** (códigos 8-17,35-36), respectivamente, como los de mayor acuerdo.

Tabla 19. Valor máximo y mínimo de similitud con el índice de Dice y Jaccard, y número de “cluster” en el dendograma para el conjunto de “primers” analizados para cada zona de muestreo.

Zona de muestreo	“PRIMER”	INDICE	Valores de similitud (Máx-Mín)	Número de “clusters”
Hoya Grande	UBC125 UBC135 UBC149	Dice	1,000-0,627	2
		Jaccard	1,000-0,457	2

La topología de los dendogramas refleja, de algún modo, la estructura génica del muestreo jerárquico, cuyas interpretaciones por “primer” fue la siguiente:

El “primer” UBC125 para Hoya Grande Zona Húmeda estableció dos “clusters”; el principal contiene a dieciocho miembros del muestreo agrupados con la máxima similitud, mientras que los dos miembros restantes, a pesar de que se encuentran separados, poseen valores de similitud muy cercanos, lo que refleja la posibilidad de que este “primer” generó poco polimorfismo con el cual poder determinar variabilidad genética presente en el muestreo, o que en realidad no existe tal variación en él; por lo tanto, los cinco niveles $N_1P_{(1,2,3,4)}$, $N_2P_{(1,2,3,4)}$, $N_3H_{(1,2,3,4)}$, $N_4L_{(1,2,3,4)}$ y $N_5L_{(1,2,3,4)}$ del muestreo jerárquico son genéticamente uniformes y provenientes, posiblemente, de una misma fuente de inóculo a nivel local en la zona de estudio.

El mismo “primer” evaluado para Hoya Grande Zona Seca estableció tres grandes “clusters”, con subgrupos internos en algunos de ellos, con un rango de valores de similitud no tan estrechos y cercanos a 1,000 como el anterior. Sólo

dos subgrupos internos, a saber: $N_4L_1-N_4L_2-N_4L_3-N_4L_4$ y $N_5L_1-N_5L_2-N_5L_3-N_5L_4$ (códigos 13-14-15-16, 17-18-19-20) pertenecientes a dos de los tres “clusters”, quedaron agrupados en correspondencia con sus respectivos niveles (**Nivel IV** y **Nivel V**) del muestreo jerárquico. Esta disposición agrupacional sugiere que, para este “primer” y zona (HGZS), no se detectó variabilidad genética a nivel de lesiones de una hoja o en diferentes puntos de una misma lesión, pero sí con respecto a los miembros de los otros niveles. Las variaciones dentro de los otros tres niveles restantes corresponden sólo a un miembro del Nivel III y a dos para los Nivel I y II.

El “primer” UBC135 estableció, para ambas zonas de muestreo, sólo dos “clusters”, pero diferentes entre si. Al igual que el “primer” UBC125, este no permitió determinar suficiente variación en el muestreo o, por el contrario, indicó que es un muestreo genéticamente homogéneo.

Con el “primer” UBC149, para la zona húmeda, se presentaron tres “clusters” con variaciones a nivel topológico en los tres primeros niveles del muestreo (**Nivel I, Nivel II, Nivel III**). El dendograma para la zona seca con este “primer” fue diferente al de la zona húmeda, determinándose dos “clusters”, cuyas similitudes muy próximas al valor de 1,000, hacen improbable sostener que exista variación, a pesar de su distribución topológica; es decir, que este “primer” no fue lo suficientemente idóneo para determinar polimorfismo en ambas zonas de muestreo.

Ambos dendogramas con los índices Dice y Jaccard, reuniendo todos los “primers” que generaron bandas polimórficas para el muestreo jerarquico Hoya Grande Zona Húmeda, poseen la misma topología, cuya estructura estableció tres

“clusters” concatenados. La disposición aleatoria de los aislados de *Mycosphaerella fijiensis* en el dendograma, sin relación alguna con los niveles que representa, sugieren que hay uniformidad génica de muestreo, debido a falta de variación en esa población muestreada, o que el polimorfismo generado por estos “primers” no es lo suficiente para establecer variaciones internas que pudiesen reflejarse en la estructura del muestreo empleado.

En el caso del muestreo jerárquico Hoya Grande Zona Seca, evaluados con los “primers” polimórficos determinados para él, se estableció para ambos índices (Dice y Jaccard), dendogramas similares, con una topología de dos “clusters” concatenados que reflejan cierta correspondencia de los aislados con los niveles que representan, observándose que tres miembros de los niveles **Nivel I** y **Nivel II** permanecen juntos, y el otro miembro de esos niveles se encuentra en el otro “cluster”, mientras que los miembros de los **Nivel III** y **Nivel IV**, al igual que los anteriores, están agrupado juntos en el otro “clusters”. Los aislados del Nivel **V** están distribuidos en ambos “clusters”. Esta disposición sugiere que existe polimorfismo génico intraespecífico en los **Niveles I-II-III** y **IV**, mientras que no hay en el último nivel (**Nivel V**).

La evaluación del conjunto global Hoya Grande (HGZH y HGZS), con los “primers” polimórficos comunes determinados para ambas zonas, reflejó el mismo dendograma con el índice de Dice y de Jaccard, estableciéndose dos grandes “clusters”. Los miembros para cada “cluster” corresponden a todos los integrantes de un mismo muestreo para cada zona estudiada, es decir que, evidentemente, hay variación genética intraespecífica a nivel de zona de muestreo. Cada “cluster” para cada zona, a su vez, presentó a sus miembros distribuidos aleatoriamente,

sin ninguna relación agrupacional de similitud para cada nivel. Esto sugiere que no hay polimorfismo génico que se correlacione con los niveles del muestreo cuando se evalúan diferencias entre ellos y, por tanto, tienen tendencia a ser monomórficos, aunque evidentemente, para ambas zonas de muestreo (HGZH-HGZS), si hubo separación del conjunto a nivel génico (polimorfismos). Una de las causas de esa poca diferenciación genética estudiada puede ser la reciente introducción al país de una población con un único genotipo de ***Mycosphaerella fijiensis***.

bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

1.- El alto nivel de fiabilidad de los análisis estadísticos con el índice de Dice y Jaccard, demuestra la confiabilidad en la generación y toma de los datos de las bandas de RAPD.

2.- El análisis de las topologías para cada “primer” y para cada zona de muestreo estudiada no refleja una diferenciación genética obvia entre los aislados de *Mycosphaerella fijiensis* que se corresponda con la estructura en niveles del muestreo jerárquico Hoya Grande, a excepción del “primer” UBC:125 HGZS, que presentó diferencias.

3.- El “primer” UBC: 125 permite observar una posible diferenciación génica en los tres primeros niveles que conforman el muestreo jerárquico para la zona seca de Hoya Grande.

4.- La topología de los dendogramas para cada “primer” y para el grupo de “primers” polimórficos para cada zona del muestreo jerárquico, es diferente en cuanto a la disposición de sus miembros (aislados) y en el número de “clusters” generados, sugiriendo la probable diferenciación génica que corresponde con las dos zonas estudiadas.

5.- Los resultados demuestran que los marcadores RAPDs permitieron establecer sutiles diferencias genéticas a nivel intraespecífico. No obstante, análisis adicionales con un mayor número de aislados, de “primers”, y de zonas bananeras con diferencias climáticas y sometidas o no a programas de fumigación, se requieren, para establecer una mayor resolución de las afinidades y/o divergencias genéticas entre las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis*.

6.- El conjunto de aislados de *Mycosphaerella fijiensis* de Hoya Grande Zona Húmeda queda total e igualmente diferenciada de Hoya Grande Zona Seca, con ambos índices de medición de similitud.

7.- La variabilidad determinada a nivel de zona de muestreo es reflejo del perfil de bandas generado con los “primers” utilizados en este estudio, más no es evidencia final de cambio genético intraespecífico en *Mycosphaerella fijiensis* para la zona de estudio de este trabajo.

PERSPECTIVA

Los cambios genéticos en las poblaciones del patógeno deben diferenciarse de los efectos epidemiológicos particulares. Es por eso que se recomienda estudiar esos posibles cambios con la respuesta a la presión del inóculo, y entender los mecanismos de liberación y propagación de las ascosporas (aéreobiología) de *Mycosphaerella fijiensis* para poder determinar el área de inoculación, bajo las condiciones climáticas del área de estudio (Hoya Grande).

BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G.N. (1997). Plant pathology. California: Academic Press.

BEVERAGGI, A. (1992). Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistants inoculés par *Cercospora fijiensis* responsable de la maladie des raies noires. Université Montpellier II, 74pp.

BOSCÁN, K. (2002). Búsqueda de genes de resistencia contra *Sigatoka negra* en *Musaceas*. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida. 107 p.

BRIDGE J. et al. (1997). Plagas de *Musa*. Hoja Divulgativa No 2. Nematodos Lesionadores de los Bananos.

BUDDENHAGEN, I. (1987). Disease susceptibility and genetics in relation to breeding of bananas and plantains. Banana and Plantain Breeding Strategies (Persley GJ, De Langhe EA, eds). ACIAR Proceedings nº 21. Canberra, Australia: ACIAR. 95-109.

CAETANO-ANOLLÉS, (1996-1998), en: <http://cropsci.uiuc.edu/faculty/gca/kaffe/tools1rapd.html>

CARLIER J. (1989-1990). Etude du polymorphisme de fragments de restriction (RFLP) chez les *Mycosphaerella spp* pathogènes des bananiers et plantains. Institut National Agronomique Paris-Grignon. 20 p.

CARLIER J. (1994). Etude de la structure des populations, par RFLP, de *Mycosphaerella fijiensis*, agent responsable de la maladie des raies noires des bananiers. Université de Paris-Sud Centre D'Orsay . Paris. 70 p.

CASTRO Y. et al (2002). *Mycosphaerella*: Comportamiento en medio líquido. Revista Forestal Venezolana (en prensa).

CHEESMAN, E. E. (1948). Classification of the bananas. IIIc. Critical notes on species (c), *M. paradisiaca*, and *M. sapientum*. Kew Bull. 2: 145-53.

CRANE, J. & BALERDI, C. (1972), en: <http://edis.ifas.ufl.edu/MG040>.

CRONSHAW, D. K. & AKERS, A. (1990). Mode de action of Tridemorph & sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*. 84-89p.

DEIGHTON, F. (1979). Studies on Cercosporas and allied genera. VII. New species and redisposition. Mycological Papers (CMI) 144: 47-52.

DEVOUARD, A. (2001). Taxonomía de los bananos. Red internacional para el mejoramiento del banano y el plátano. Boletín de INIBAP.

FAO. (1998), en: <http://pa.esalq.usp.br/frut0501.pdf>.

FAO. (1999). FAOSTAT statistics database: Agriculture, en: <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?subset=agriculture>.

FOURE, E. (1982). Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladie des raies noires).I. Incubation et évolution de la malaide. Fruits, 37 : 749-771.

FOURÉ E. (1985). Fruits 40: 393-399.

FULLERTON R. H. & OLSEN, T. L. (1992). Pathogenic variability of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. In: Breeding Banana & Plantain for Resistance to Diseases & Pests, (ed.), CIRAD-INIBAP, Montpellier, France, p 201-211.

GARCIA, M. & et al. (1997-1999). Sigatoka defense genes of banana cultivars and wild *Musa* species in Latin America., en: Sigatoka defense genes of banana cultivars and wild *Musa* species in Latin America. Annual Report I y II. Partner 4. ULA (1997-1999).

GONZÁLEZ, M. (1988). Sigatoka negra agente causal y síntomas (Mimeografiado) MAC. S.A.S.A. 10p.

GONZÁLEZ, (1988); **PONS,** (1989); **PINEDA y CARRASCO,** (1995), en: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/monografias/banano/contenido/sigatokanegra.htm-49k>.

GRAHAM, G. MAYERS, P. & HENRY, R. (1994). A Simplified Method for the Preparation of Fungal Genomic DNA for PCR and RAPD Análisis. BioTechniques vol 16 N° 1. 48-49 p.

GUZMÁN, M. & et al. (1998). Report: Taller sobre la Sigatoka: 16-19 p.

HERNÁNDEZ, J. & ORDOSGOITTI, A. (1996). Epidemiología y manejo de la Sigatoka negra en Venezuela (proyecto sometido a CONICIT9. M.A.C., FONAIAP. (Mimeografiado). 27p.

HERNÁNDEZ, J.; ORDOSGOITTI, A. & MORILLO, (1997), en: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/monografias/banano/contenido/sigatokanegra.htm-49k>.

INIBAP (2001 a). Taxonomía de los báñanos, en: http://www.inibap.org/publications/inibap-factsheets_spa/ usos. pdf.

INIBAP (2001 b). Muchos usos de *Musa*, en: http://www.inibap.org/publications/inibap-factsheets_spa/usos.pdf.

INIBAP (2003). Banana diversity, en: http://www.inibap.org/publications/inibap-factsheets_eng/diversity.pdf.

INNIS, A. & GELFAND, D. (1990). Optimization of PCRs: PCR Protocols a Guide to Methods & Applications.

JOHANSON, A. (1995). Detection of banana leaf spot pathogen by PCR. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 25, 99-107.

JOHANSON, A. et al (1994). The Use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* & *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana. Plant. Pathology 43:701-707.

JOHANSON, A. & JEGGER M. J. (1993). Use of PCR of detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana & plantain. Mycol. Res. 97 (6): 670-674.

LAMB, CH. (1994). Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. Cel: 76, 419-422.

LARA, A. & et al. (2003). Variabilidad y diferenciación genética en cuatro poblaciones de la planta medicinal *Psychotria acuminata* en Costa Rica. en: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v27n02_029.pdf.

LAVENTY, I. (1992-1993). Etude de la cercosporiose noire du bananier: Effets, au niveau cellulaire, d'extraits toxiques de *Mycosphaerella fijiensis* chez un bananier (cv. Fougamou), partiellement resistant a la maladie des raies noires. Faculte Des Sciences Agronomiques De Gembloux. Belgica, 58p.

LEHMANN, D. H. (1984). Diseño detallado del estudio epidemiológico de Sigatoka negra y amarilla en plátanos y bananos. Proyecto: "Apoyo al Programa Subregional Andino contra la Sigatoka negra del Banano y del Plátano". Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación (FAO) Informe Técnico Preliminar, Proyecto FAO: PCT/RLA. Lima, Perú, 25 de Octubre, 38p.

LEPOIVRE, P.; ACUNA, C. & RIVEROS, A. (1993). Screening procedures for improving resistance to banana black leaf streak disease. Ganry J. (ed). Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pest. Montpellier, France: CIRAD, in collaboration with INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France). 422-423 p.

MARÍN, C. (2003) Taxonomía Numérica. Maracay .53p.

- MERCHÁN, V.** (1996). Prevención y manejo de la Sigatoka negra. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Boletín Informativo. 30 p.
- MEREDITH, D.S.** (1970). Banana Leaf Spot Disease (Sigatoka) Caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. Issued. Phytopathological Paper N- 11.
- MEREDITH, D.S. & LAWRENCE, J. S.** (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Trans Br. Mycol. Soc. 52: 459-476.
- MORENO et al.** (1997) Análisis de la variabilidad intravarietal de la vid mediante el empleo de marcadores de alta eficacia, en: [http:// www.acenologia.com/ciencia56_5.htm](http://www.acenologia.com/ciencia56_5.htm) - 46k.
- MOURICHON X.** (1995). *Mycosphaerella fijiensis*: Diversity and Possibilities for the Early Screening of Germplasm for Resistance. Laboratoire de Pathologie Végétale, CIRAD-FLHOR, BP 5035,34032 Montpellier Cedex 1, France. 47-53.
- MOURICHON, X. & FULLERTON, R. A.** (1990). Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *Mycosphaerella fijiensis* (*Cercospora fijiensis*), respectively agents of Sigatoka disease in bananas and plantains. Fruits 45(3):213-218.
- MOURICHON X. & ZAPATER M. F.** (1990). Obtention in vitro du stade *Mycosphaerella fijiensis*, forme parfaite de *Cercospora fijiensis*. Fruits, 45 (6), 553-557.
- MULLIS, K. B., et .al.** (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335–350.
- NAVA, C.; VILLARREAL E. & VILLALOBOS, R.** (1998). Comportamiento de plántulas del clon de plátano Harton (*Musa AAB*) en el Sur del Lago de Maracaibo. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 15-10.
- ORTIZ, R. & VUYLSTEKE, D.** (1996). Recent advances in *Musa* genetics, breeding and biotechnology. Plant Breeding Abstracts 66:1355-1363.
- PINEDA, J. Y CARRASCO, A.** (1995). Morfología de las estructuras reproductivas de *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (Teleomorfo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de las zonas bananeras de Venezuela (Mimeografiado) UCLA.44p.
- PONS, N.** (1987). Notes on *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Trans. Br. Mycol. Soc.89: (1), 120-124.
- PONS, N.** (1989). Taxonomy of *Cercospora* & related genera. In Sigatoka leaf spot diseases (Proceedings-Costa Rica) INIBAP. 360-370.

PONS, (1987) & GONZÁLEZ, (1988), en: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/monografias/banano/contenido/sigatokanegra.htm-49k>.

RHODES, P. L. (1964). A new banana disease in Fiji. Commonwealth Phytopathological News 10:38-41.

ROBINSON, J.C. (1996). Bananas and plantains. Wallingford, UK: CAB International.

ROHLF, F. (1990). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Department of Ecology and Evolution State University of New York.

SAMBROOK, J.; FRITRSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). Gel Electrophoresis of DNA. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition. Pp. 6.3-6.13.

SAN ROMAN, M. (1999). Estudios de variabilidad genética en patógenos agrícolas: Identificación de marcadores moleculares con el uso de RAPD para la caracterización de micorrizas vesiculares-arbusculares a partir de esporas. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida.68p.

SANCHEZ, J. (2003), en: <http://www.arbolesornamentales.com/autor.htm>

SIMMONDS, N. W. & SHEPHERD, K. (1955.). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. J. Linn. Soc. S5: 302-12.

STOVER, R. H. (1963 a). Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: associated ascomycetous fungi. Canadian J. Botany. 41, 1481-1485.

STOVER, R. H. (1963 b). Sexuality and heterothallism in *Mycosphaerella musicola*. Can. J. Bot., 41.1531-1532.

STOVER, R.H. (1969 a). The *Mycosphaerella* species associated with banana leaf spots. Tropical Agric., 46,325-332.

STOVER, R. H. (1969 b). Leaf Spot of Bananas Caused by *Mycosphaerella musicola*: Role of Conidia in Epidemiology. Tropical Research Department, Tela Railroad Company (a subsidiary of the United Fruit Company), La Lima, Honduras. 856-860.

STOVER, R. H. (1972). Banana, plantain and abaca disease. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England.

STOVER, R.H. (1974). Pathogenic and morphologic variation in *Mycosphaerella fijiensis* (*M. musicola*). Proceedings of the America Phytopathological Society 1, 123 p.

STOVER, R. H. (1980). Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease* 64: 750-755.

STOVER, R. H. & SIMMONDS, N. W. (1987). Bananas. Third edition. Longman Scientific Technical. 468p.

STOVER, R.H. (1990). Sigatoka leaf spots: thirty years of changing control strategies. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) *Sigatoka Leaf Spot Diseases of Banana*, INIBAP: Montpellier, 66-74.

SWENNEN, R. & VUYLSTEKE, D., (1993). Breeding black Sigatoka resistant plantains with a wild banana. *Trop. Agric. (Trinidad)* Vol. 70. No. 1.

THOMPSON, J. & BURDON, J. (1992). Gene-for-gene coevolution between plants and parasites. *Nature*. 360:121-125.

URDANETA, R. (1991). Principales enfermedades en el cultivo de Musaceas del estado Zulia, Maracaibo, Ven. FONAIAP-Estación experimental Zulia. Serie B. No. 19: 40 p.

VUYLSTEKE, D. & ORTIZ, R. (1995). Plantain-derived Diploid Hybrids (TMP2x) with Black Sigatoka Resistance. *HortScience* 30 (1): 147-149.

VUYLSTEKE, D. & SWENNEN R. (1991). Development and performance of tetraploid hybrids of plantain (*Musa* spp., AAB group) with Black Sigatoka-resistant. In: Gold and Semill (eds). *Biological and integrated control of hiphol and banana and plantain pest and diseases proceedings of a researchs coordination meeting, cotonou. Benin.* Pp 324-335.

WELSH & MCCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

ANEXOS
bdigital.ula.ve

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
 PARA HGZH CON EL "PRIMER" UBC: 125

```

===== MXCOMPJ ===== 11/27/103 10:52 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\C.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFE~1.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\C.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 190
      Mean X = 0.98599 SSx = 0.17324
      Mean Y = 0.98599 SSy = 0.15482

      Tests for association:

      Matrix correlation: r = 0.94535
      (= normalized Mantel statistic Z)

      Approximate Mantel t-test: t = 4.347
      Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000
    
```

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
 PARA HGZS CON EL "PRIMER" UBC125

```

===== MXCOMPJ ===== 11/27/103 10:56 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\J.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFE~1.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\J.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 190
      Mean X = 0.77556 SSx = 1.83219
      Mean Y = 0.77556 SSy = 1.14462

      Tests for association:

      Matrix correlation: r = 0.79040
      (= normalized Mantel statistic Z)

      Approximate Mantel t-test: t = 10.458
      Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000
    
```

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
PARA HGZH CON EL "PRIMER" UBC: 135

```

===== MXCOMPJ ===== 11/27/103 11:12 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\D.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFE~1.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\D.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 190
      Mean X = 0.97293 SSx = 0.59549
      Mean Y = 0.97293 SSy = 0.59549

      Tests for association:

      Matrix correlation: r = 1.00000
      (= normalized Mantel statistic Z)

      Approximate Mantel t-test: t = 4.963
      Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000

```

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
PARA HGZS CON EL "PRIMER" UBC: 135

```

===== MXCOMPJ ===== 11/27/103 11:19 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\M.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFE~1.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\M.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Mean Y = 0.95158 SSy = 2.07769

      Tests for association:

      Matrix correlation: r = 0.99597
      (= normalized Mantel statistic Z)

      Approximate Mantel t-test: t = 4.454
      Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 190
      Mean X = 0.95158 SSx = 2.09453

```

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
PARA HGZH CON EL "PRIMER" UBC: 149

```

===== MXCOMPJ ===== 11/27/103 11:28 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE TRES 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\G.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFE~1.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE TRES 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\G.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
  " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
    " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
          N      =      190
Mean X = 0.89195 SSx = 1.97027
Mean Y = 0.89195 SSy = 1.87798

      Tests for association:

      Matrix correlation:          r = 0.97630
      (= normalized Mantel statistic Z)

      Approximate Mantel t-test:   t = 4.993
      Prob. random Z < obs. Z:    p = 1.0000

```

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
PARA HGZS CON EL "PRIMER" UBC: 149

```

===== MXCOMPJ ===== 11/27/103 11:32 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\N.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFE~1.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\N.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
  " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
    " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
          N      =      190
Mean X = 0.94789 SSx = 0.47416
Mean Y = 0.94789 SSy = 0.47416

      Tests for association:

      Matrix correlation:          r = 1.00000
      (= normalized Mantel statistic Z)

      Approximate Mantel t-test:   t = 13.315
      Prob. random Z < obs. Z:    p = 1.0000

```

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE DICE
 PARA HGZH (2) CON EL CONJUNTO DE "PRIMER" UBC: 115-125-135-149

```

===== MXCOMPG ===== 11/27/103 11:37 =====
      X matrix: C:\DICE.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HGZH2.TXT, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\DICOFE~1.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HGZH2.TXT, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\DICE.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\DITREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 190
      Mean X = 0.94926 SSx = 0.19004
      Mean Y = 0.94926 SSy = 0.16718

      Tests for association:

      Matrix correlation: r = 0.93792
      (= normalized Mantel statistic Z)

      Approximate Mantel t-test: t = 4.953
      Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000
  
```

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
 PARA HGZH (2) CON EL CONJUNTO DE "PRIMER" UBC: 115-125-135-149

```

===== MXCOMPG ===== 11/27/103 11:37 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HGZH2.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFE~1.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HGZH2.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 190
      Mean X = 0.90512 SSx = 0.60325
      Mean Y = 0.90512 SSy = 0.53200

      Tests for association:

      Matrix correlation: r = 0.93909
      (= normalized Mantel statistic Z)

      Approximate Mantel t-test: t = 5.041
      Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000
  
```

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE DICE
 PARA HGZS (6) CON EL CONJUNTO DE "PRIMER" UBC: 115-125-135-149

```

===== MXCOMP G ===== 11/27/103 12:41 =====
      X matrix: C:\DICE.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE SEIS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HGZS6.TXT, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\DICOFENE.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE SEIS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HGZS6.TXT, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\DICE.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\DITREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 190
      Mean X = 0.88814 SSx = 0.48998
      Mean Y = 0.88814 SSy = 0.36447
    
```

Tests for association:

Matrix correlation: **r = 0.86247**
 (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: t = 11.792
 Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
 PARA HGZS (6) CON EL CONJUNTO DE "PRIMER" UBC: 101-125-135-149

```

===== MXCOMP G ===== 11/27/103 12:41 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE SEIS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HGZS6.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFENE.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE SEIS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HGZS6.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=20 by 20, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 190
      Mean X = 0.80257 SSx = 1.30462
      Mean Y = 0.80257 SSy = 1.00339
    
```

Tests for association:

Matrix correlation: **r = 0.87698**
 (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: t = 11.974
 Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE DICE
 PARA HG CON EL CONJUNTO DE "PRIMER" UBC: 115-125-135-149

```

===== MXCOMP G ===== 11/27/103 9:04 =====
      X matrix: C:\DICE.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HG2.NTS, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=40 by 40, nc=none
      Y matrix: C:\DICOFENE.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HG2.NTS, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\DICE.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\DICETREE.NTS
      type=3, size=40 by 40, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 780
      Mean X = 0.79869 SSx = 12.54757
      Mean Y = 0.79869 SSy = 11.02736
    
```

Tests for association:

Matrix correlation: **r = 0.93746**
 (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: t = 26.145
 Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000

VALOR DEL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENETICA CON EL INDICE DE JACCARD
 PARA HG CON EL CONJUNTO DE "PRIMER" UBC: 115-125-135-149

```

===== MXCOMP G ===== 11/27/103 9:06 =====
      X matrix: C:\JACCARD.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HG2.NTS, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      type=3, size=40 by 40, nc=none
      Y matrix: C:\JACOFENE.NTS
      Comments:
      "HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
" SIMQUAL: input=C:\HG2.NTS, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
      " SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
      " COPH: tree=C:\JACTREE.NTS
      type=3, size=40 by 40, nc=none
      X matrix stored in RAM memory.
      Y matrix stored in RAM memory.
      N = 780
      Mean X = 0.68373 SSx = 25.13563
      Mean Y = 0.68373 SSy = 22.88131
    
```

Tests for association:

Matrix correlation: **r = 0.95410**
 (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: t = 26.227
 Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000

RAPD MUESTREO HGZH “PRIMERS” UBC: 129-135

Nivel I (N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), Nivel II (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), Nivel III (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), Nivel IV (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), Nivel V (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

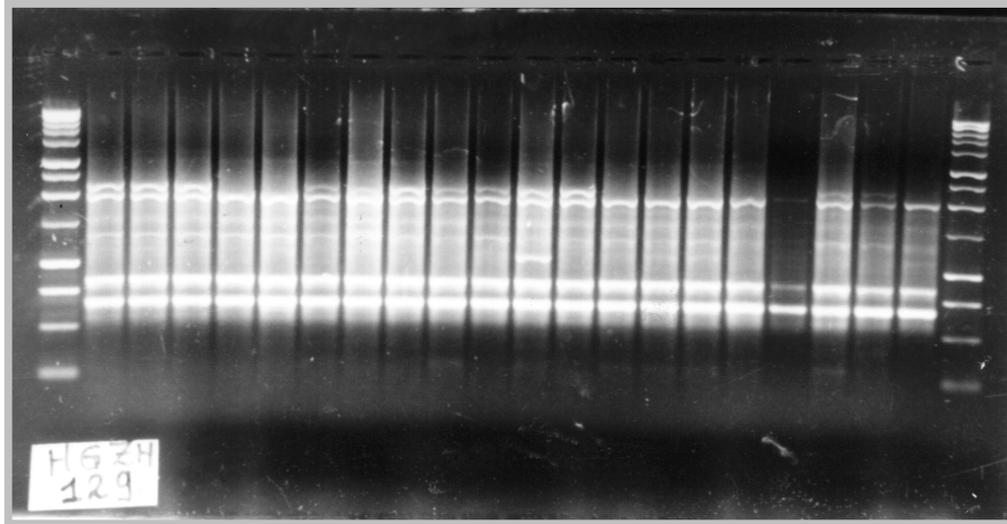


Fig. 19 Perfil electroforético con el “primer” UBC: 129 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

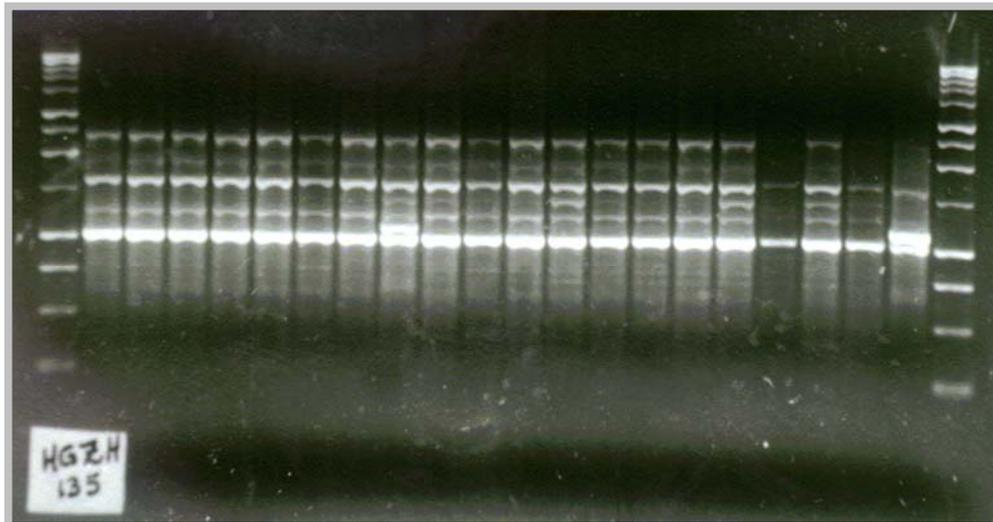


Fig. 20 Perfil electroforético con el “primer” UBC: 135 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

RAPD MUESTREO HGZH "PRIMERS" UBC: 137-138

Nivel I (N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), Nivel II (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), Nivel III (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), Nivel IV (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), Nivel V (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

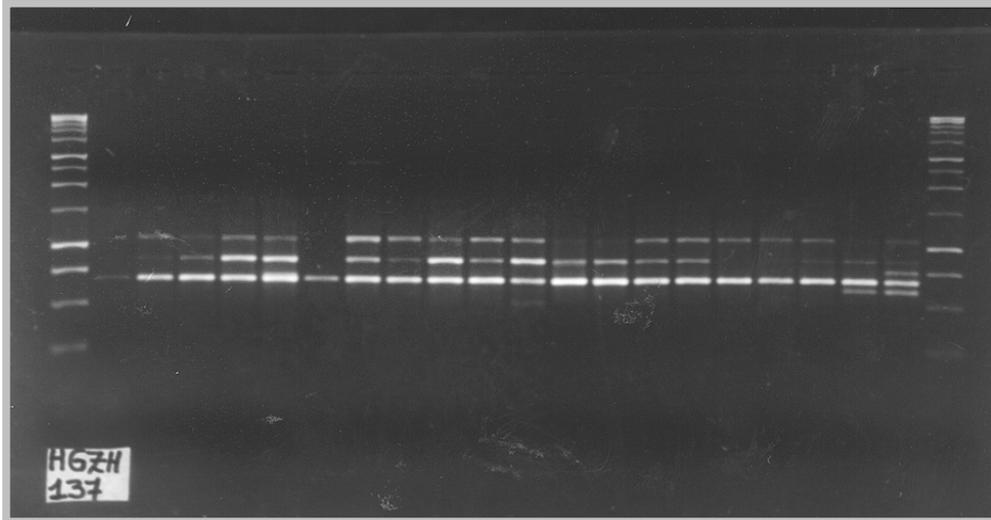


Fig. 21 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 137 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

bdigital.ula.ve

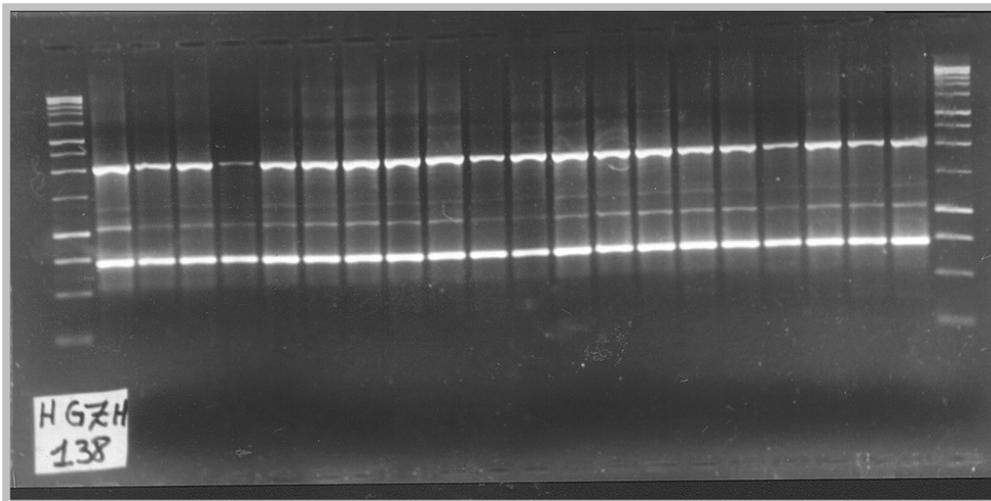


Fig. 22 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 138 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

RAPD MUESTREO HGZH "PRIMERS" UBC: 149

Nivel I Nivel II Nivel III Nivel IV Nivel V
(N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

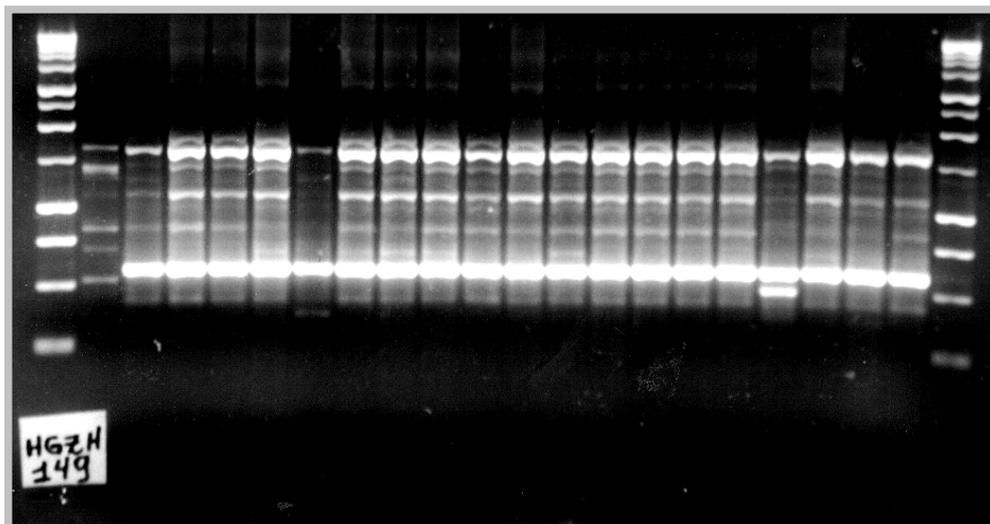


Fig. 23 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 149 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZH, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

RAPD MUESTREO HGZS "PRIMERS" UBC: 103

Nivel I Nivel II Nivel III Nivel IV Nivel V
(N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

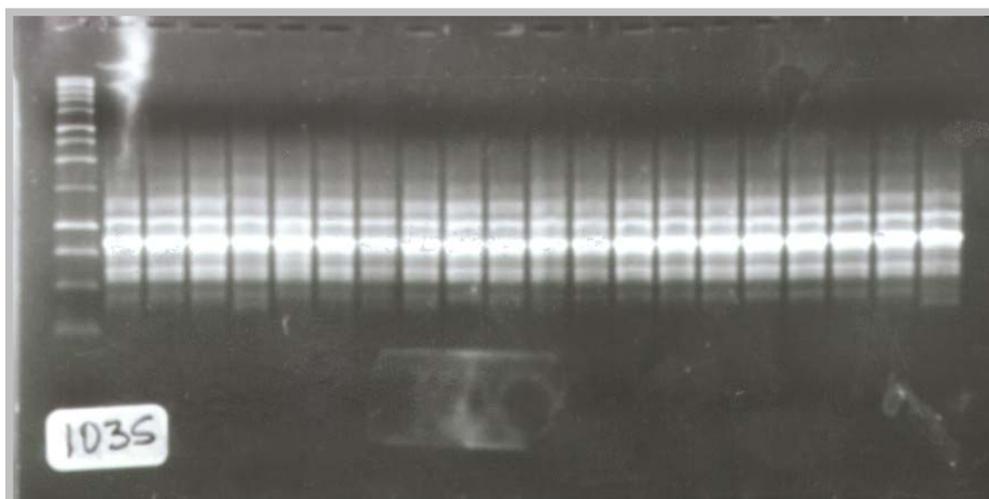


Fig. 24 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 103 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb

RAPD MUESTREO HGZS "PRIMERS" UBC: 104-105

Nivel I (N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), Nivel II (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), Nivel III (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), Nivel IV (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), Nivel V (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

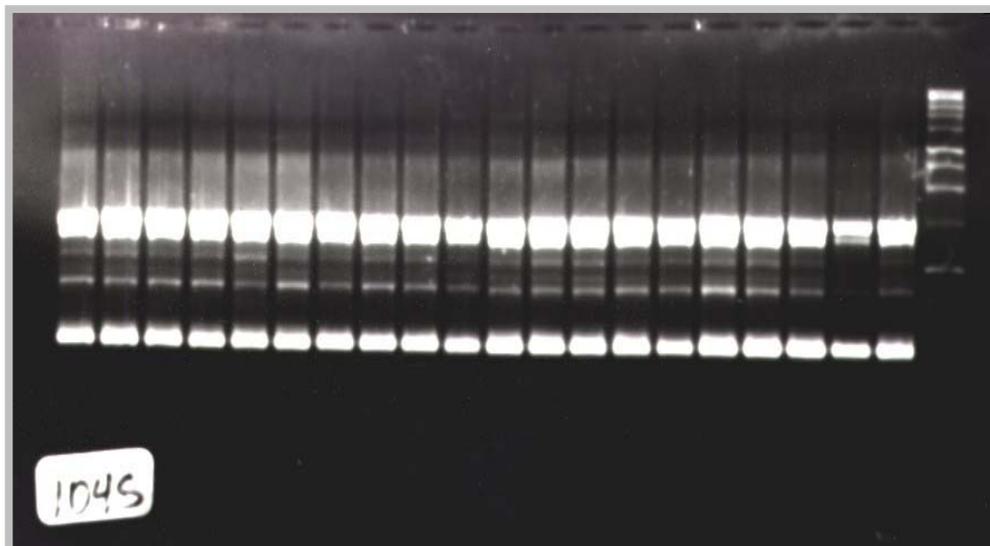


Fig. 25 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 104 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/ μ l) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb

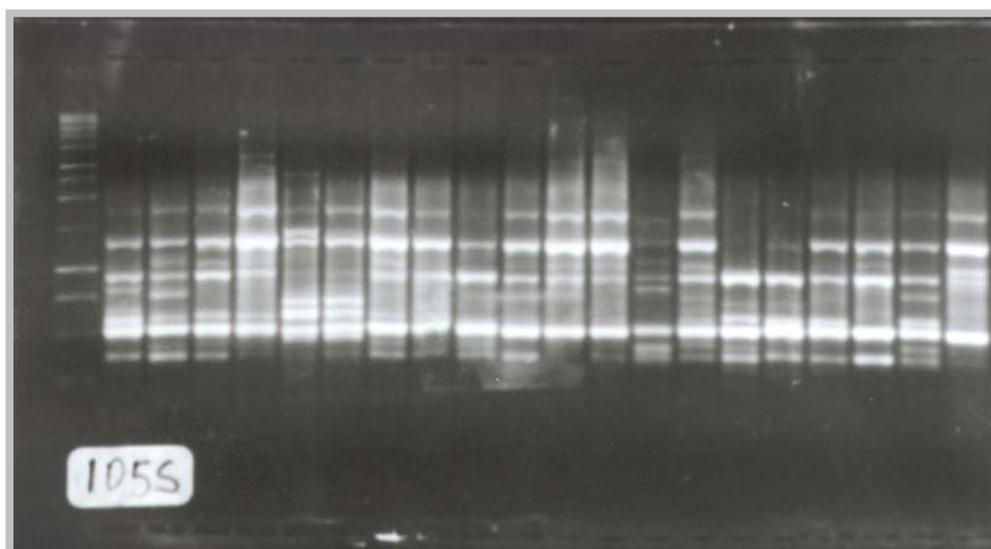


Fig. 26 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 105 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/ μ l) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb

RAPD MUESTREO HGZS "PRIMERS" UBC: 106-108

Nivel I (N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), Nivel II (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), Nivel III (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), Nivel IV (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), Nivel V (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

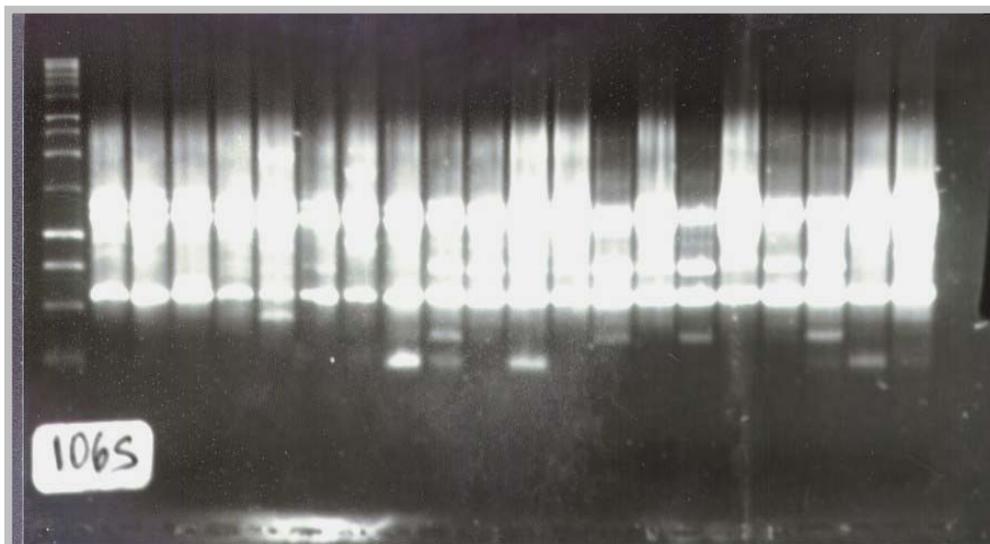


Fig. 27 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 106 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb

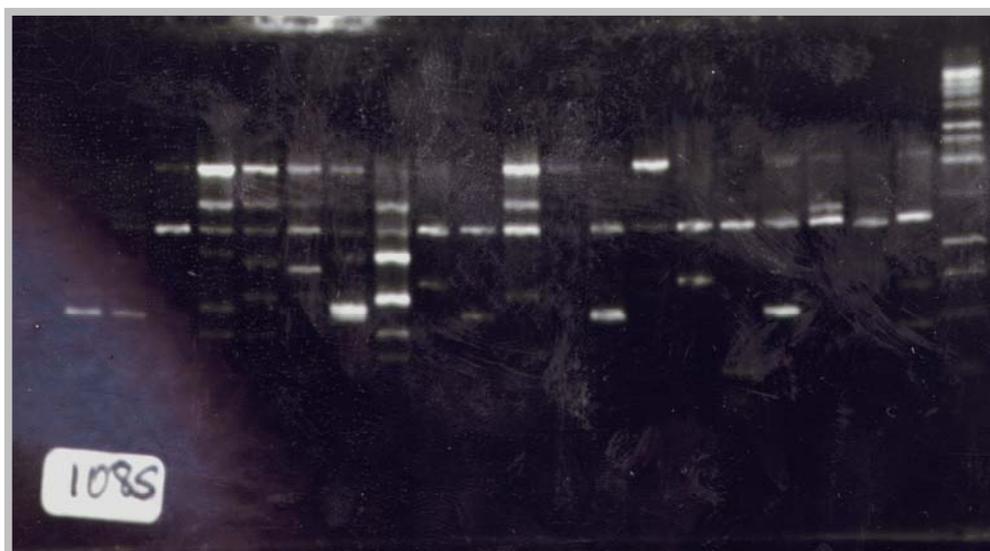


Fig. 28 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 108 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb

RAPD MUESTREO HGZS "PRIMERS" UBC: 111-115

Nivel I Nivel II Nivel III Nivel IV Nivel V
(N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

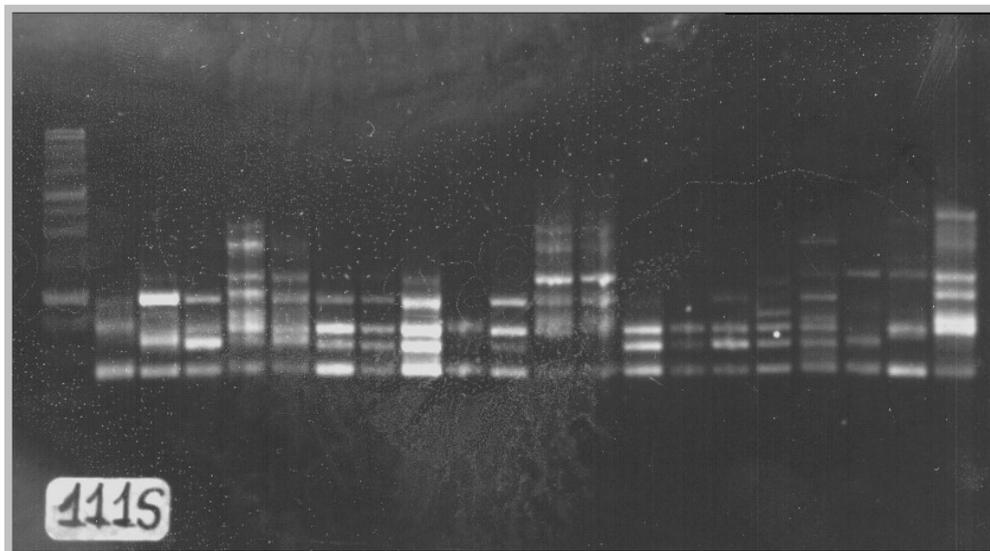


Fig. 29 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 111 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

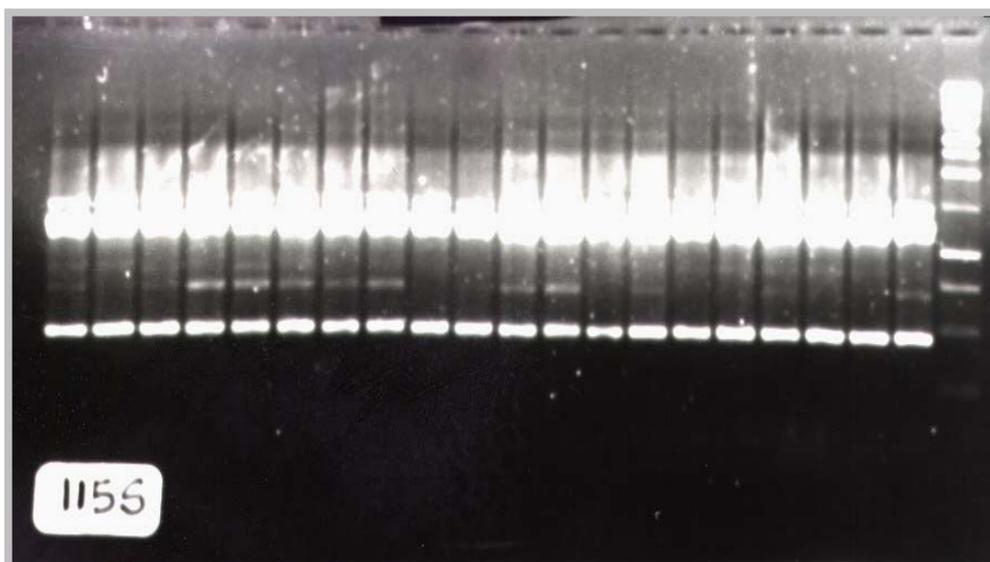


Fig. 30 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 115 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

RAPD MUESTREO HGZS "PRIMERS" UBC: 125-127

Nivel I Nivel II Nivel III Nivel IV Nivel V
(N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

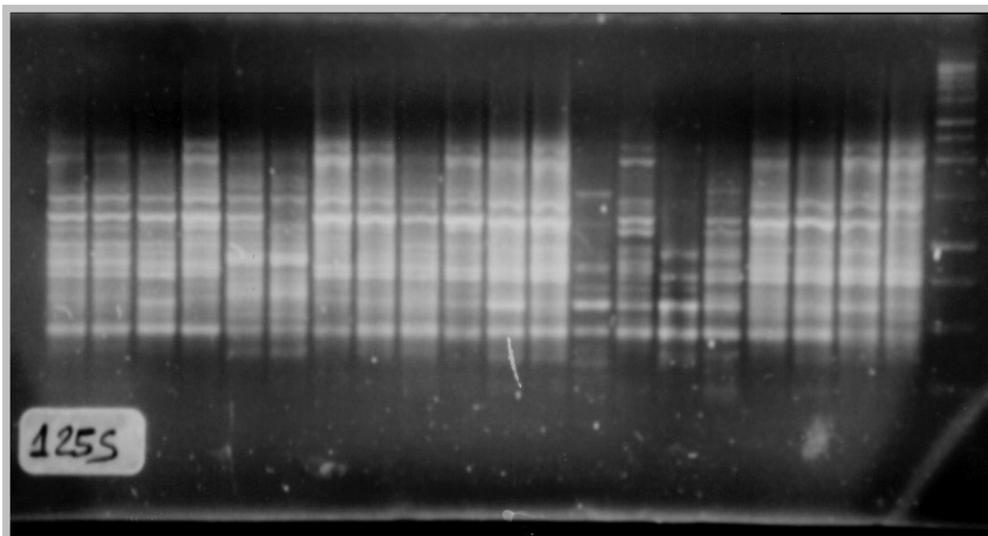


Fig. 31 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 125 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

bdigital.ula.ve

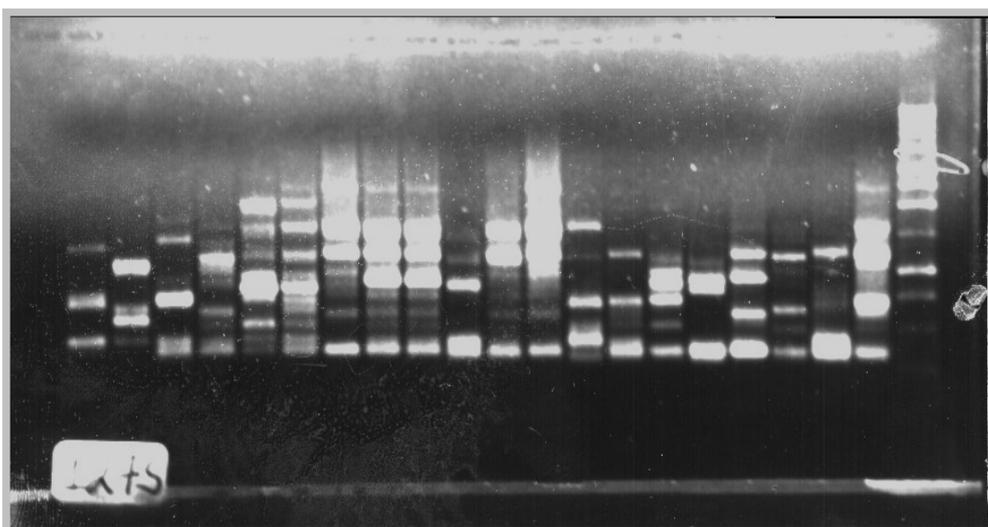


Fig. 32 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 127 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

RAPD MUESTREO HGZS "PRIMERS" UBC: 135-138

Nivel I (N₁P₁-N₁P₂-N₁P₃-N₁P₄), Nivel II (N₂P₁-N₂P₂-N₂P₃-N₂P₄), Nivel III (N₃H₁-N₃H₂-N₃H₃-N₃H₄), Nivel IV (N₄L₁-N₄L₂-N₄L₃-N₄L₄), Nivel V (N₅L₁-N₅L₂-N₅L₃-N₅L₄)

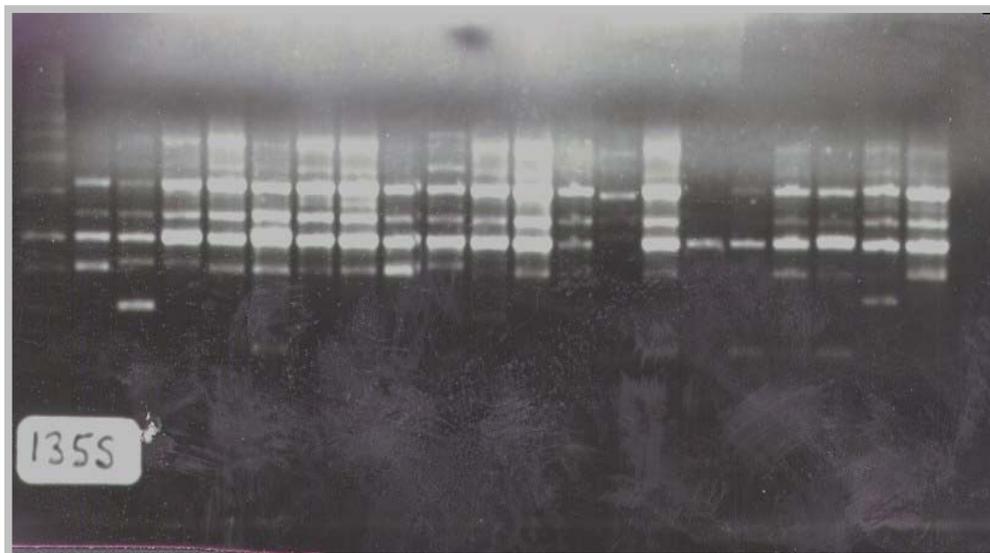


Fig. 33 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 135 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%⁹ x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.



Fig. 34 Perfil electroforético con el "primer" UBC: 138 con el ADN de *Mycosphaerella fijiensis* a la concentración de 50ng (2ng/μl) correspondiente a HGZS, corrido en gel de agarosa (1%) x 3 h y con la escalera de peso molecular lambda 1 kb.

DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZH CON EL "PRIMER" UBC125

===== TREE ===== 11/27/103 10:50 =====

Phenogram from tree matrix: C:\JACTREE.NTS

Comments:

"HOYA GRANDE UNO 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \C.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000

" SAHN: input=C:\JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN

type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZS CON EL "PRIMER" UBC125

===== TREE ===== 11/27/103 10:54 =====

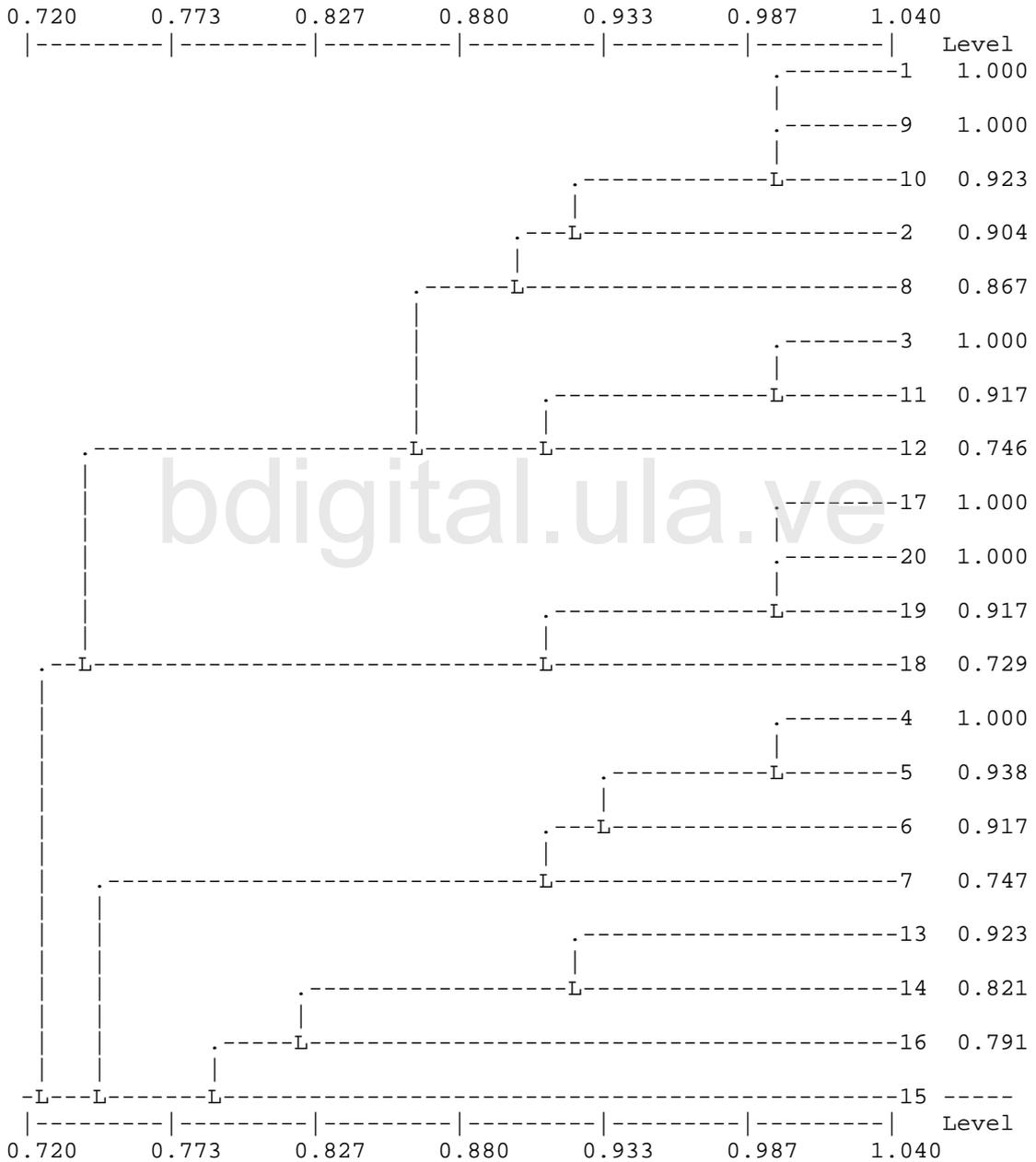
Phenogram from tree matrix: C:\JACTREE.NTS

Comments:

"HOYA GRANDE UNO 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \J.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000

"SAHN: input=C: \JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZH CON EL "PRIMER" UBC135

===== TREE ===== 11/27/103 11:10 =====

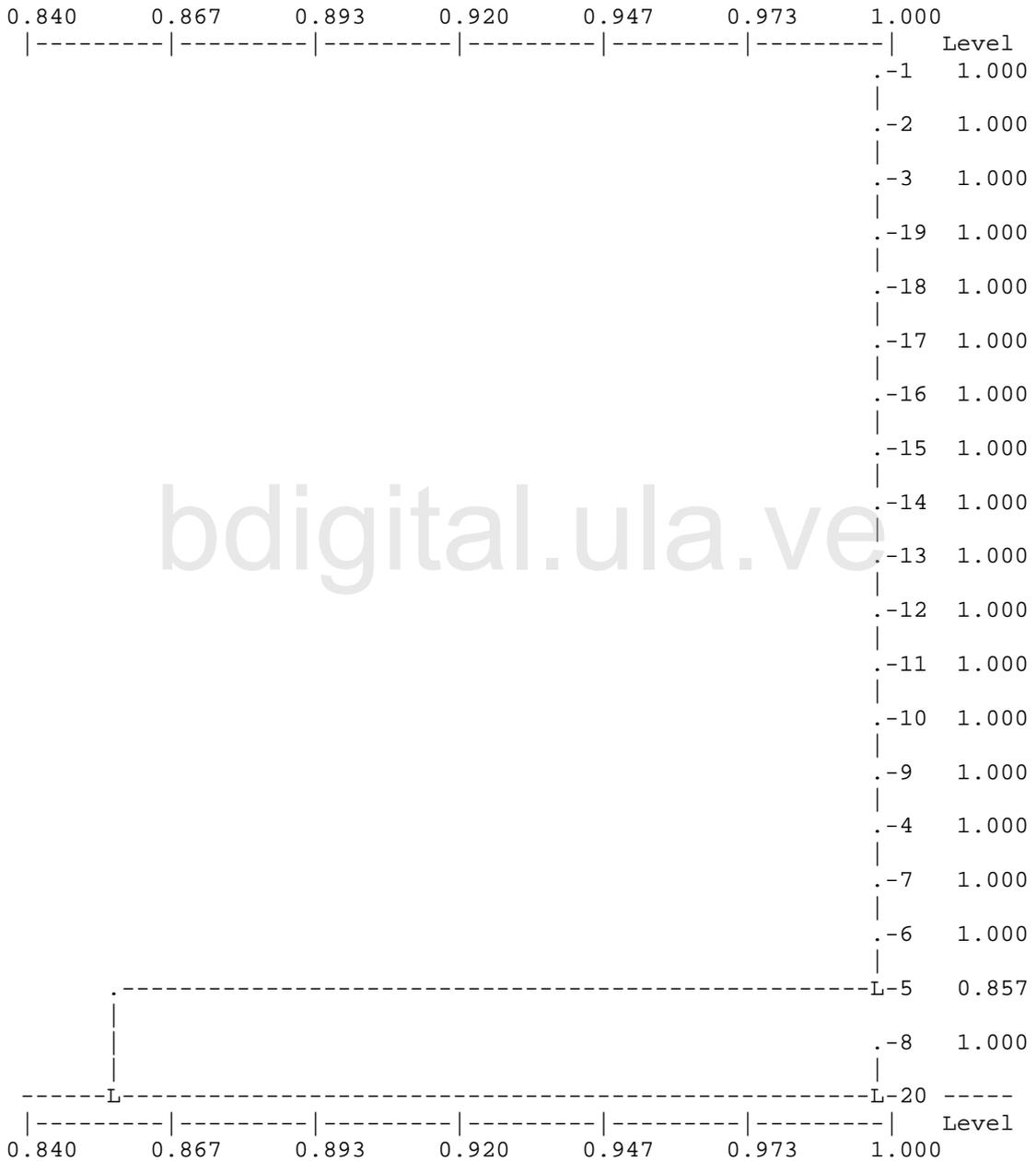
Phenogram from tree matrix: C:\JACTREE.NTS

Comments:

"HOYA GRANDE UNO 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \D.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000

"SAHN: input=C: \JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZS CON EL "PRIMER" UBC135

===== TREE ===== 11/27/103 11:18 =====

Phenogram from tree matrix: C:\JACTREE.NTS

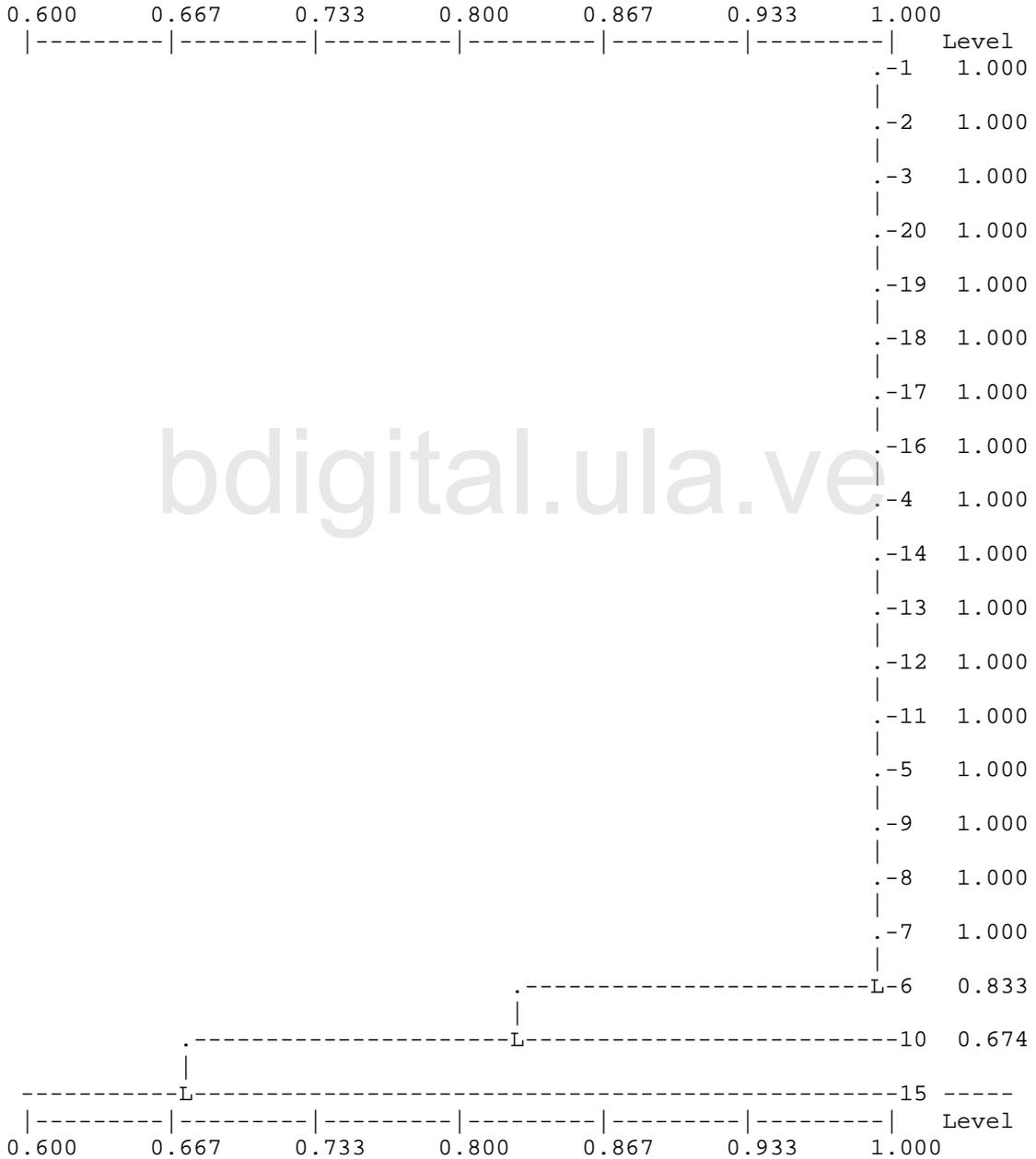
Comments:

"HOYA GRANDE DOS 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \M.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000

"SAHN: input=C: \JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN

type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZH CON EL "PRIMER" UBC149

===== TREE ===== 11/27/103 11:27 =====

Phenogram from tree matrix: C:\JACTREE.NTS

Comments:

"HOYA GRANDE TRES 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \G.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000

"SAHN: input=C: \JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZS CON EL "PRIMER" UBC149

===== TREE ===== 11/27/103 11:30 =====

Phenogram from tree matrix: C:\JACTREE.NTS

Comments:

"HOYA GRANDE UNO 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \N.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000

"SAHN: input=C: \JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE DICE PARA HGZH (2) CON EL CONJUNTO DE
 "PRIMERS" UBC: 125-135-149

===== TREE ===== 4/27/104 11:59 =====

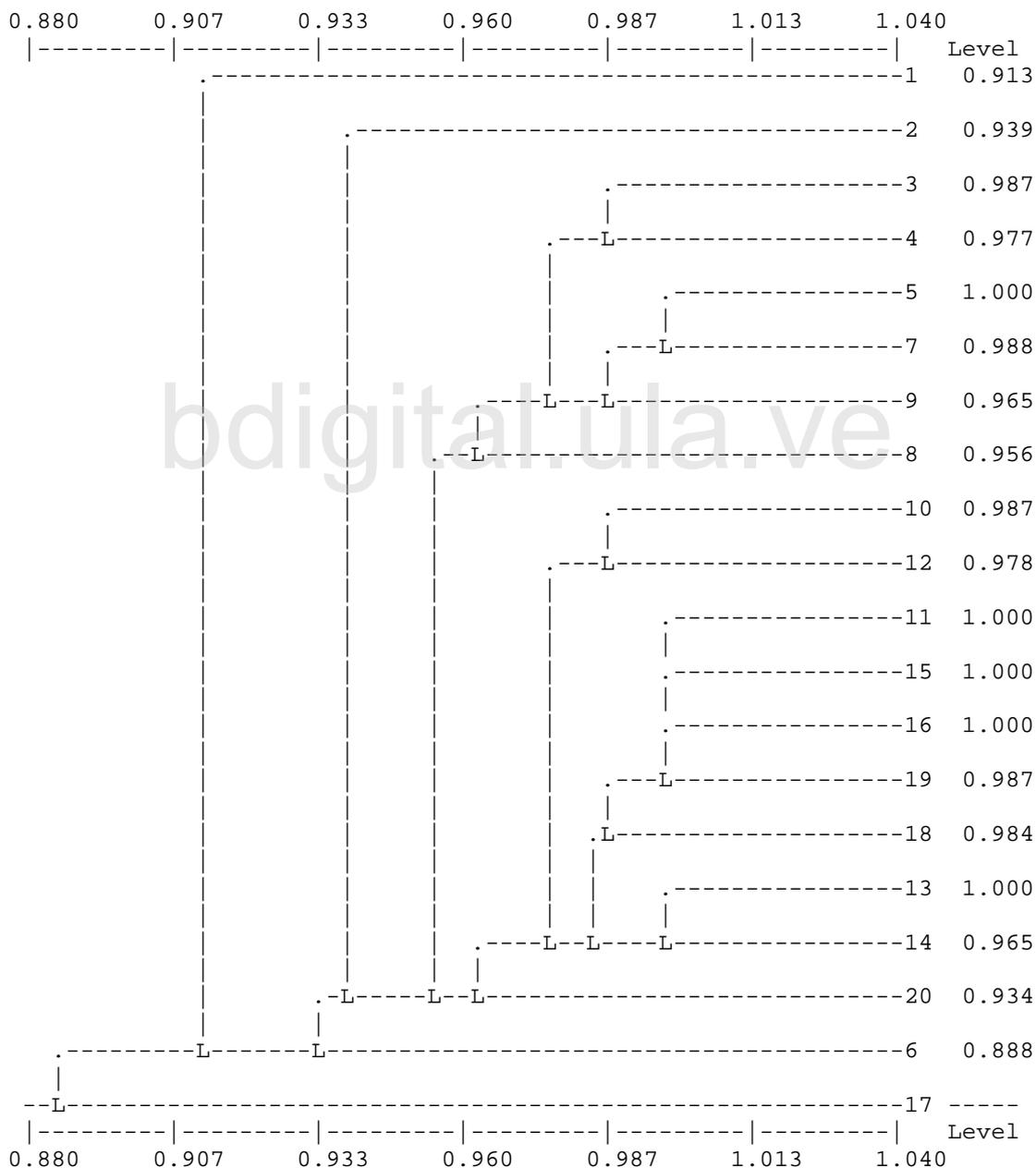
Phenogram from tree matrix: C:\HGZH2\DICECLU.NTS

Comments:

"HOYA GRANDE DOS 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C:\HGZH2.TXT, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -=
 0.00000

"SAHN: input=C:\HGZH2\DICE.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
 type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZH (2) CON EL CONJUNTO DE
 "PRIMERS" UBC: 125-135-149

===== TREE ===== 4/27/104 12:07 =====

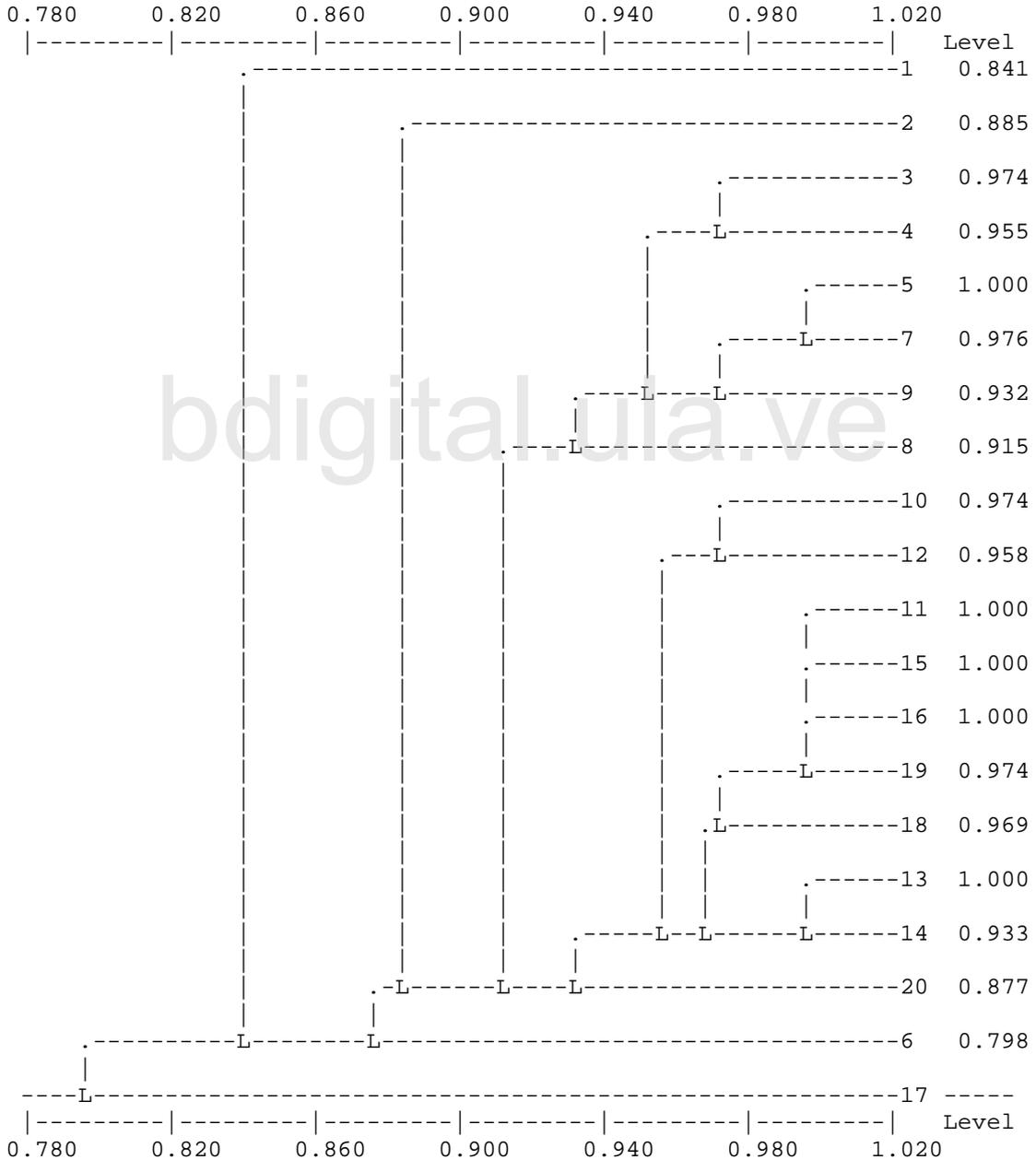
Phenogram from tree matrix: C:\JACTREE.NTS

Comments:

"HOYA GRANDE DOS 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \HGZH2.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -=
 0.00000

"SAHN: input=C: \JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
 type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE DICE PARA HGZS (6) CON EL CONJUNTO DE
 "PRIMERS" UBC: 125-135-149

===== TREE ===== 4/27/104 12:14 =====

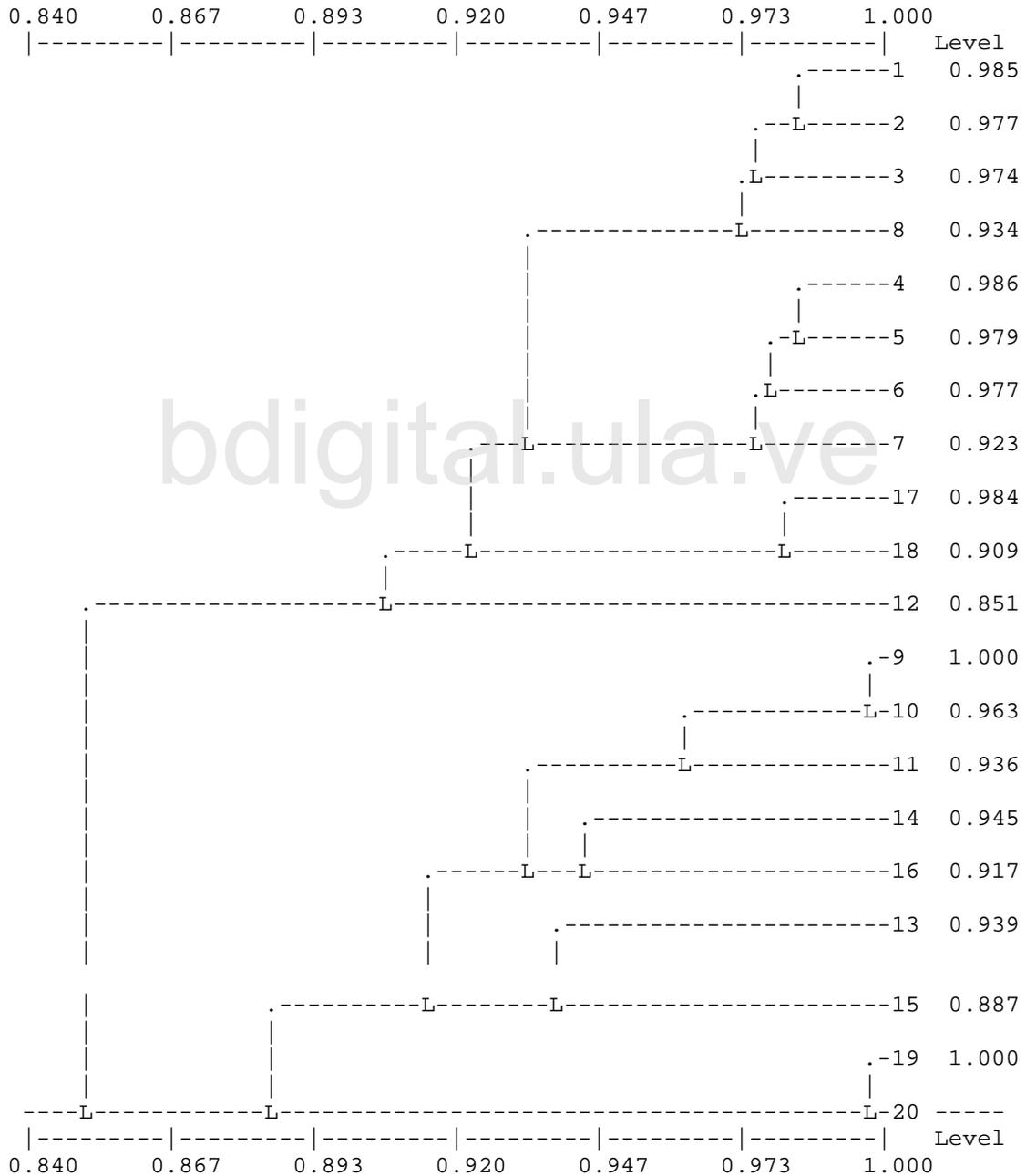
Phenogram from tree matrix: C:\DITREECE.NTS

Comments:

"HOYA GRANDE SEIS 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \HGZS6.TXT, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -=
 0.00000

"SAHN: input=C: \DICE.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
 type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZS (6) CON EL CONJUNTO DE
 "PRIMERS" UBC: 115-125-135-149

===== TREE ===== 4/27/104 12:23 =====

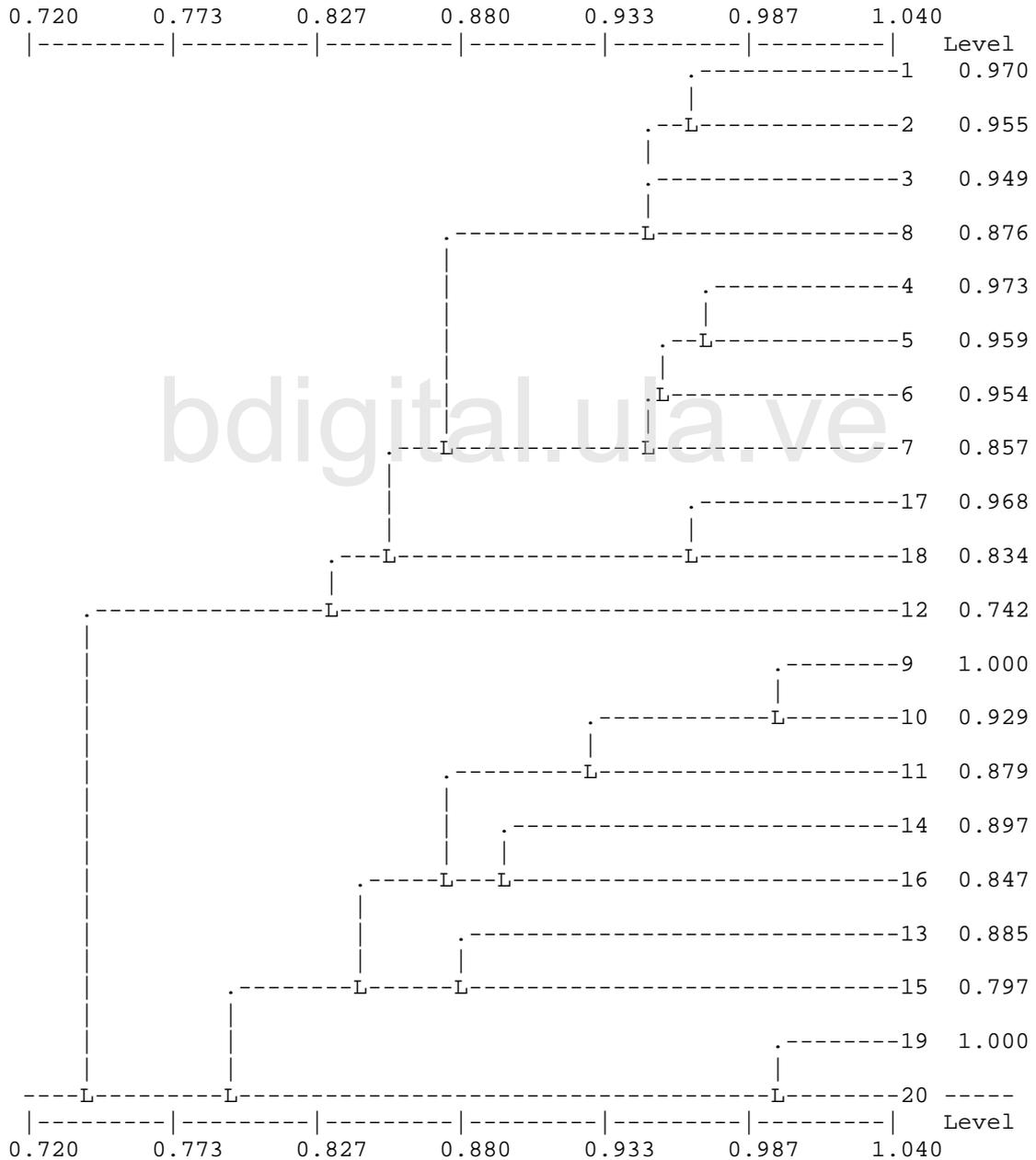
Phenogram from tree matrix: C:\JACTREE.NTS

Comments:

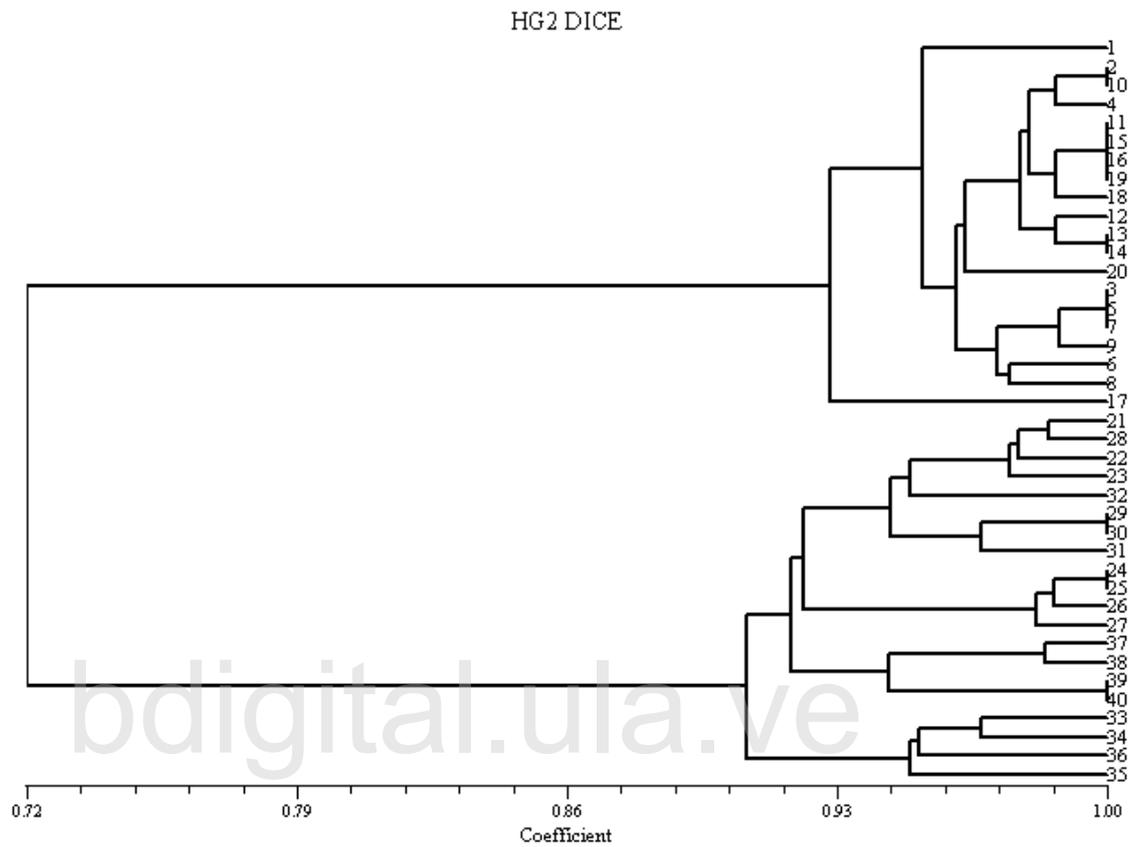
"HOYA GRANDE SEIS 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \HGZS6.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -=
 0.00000

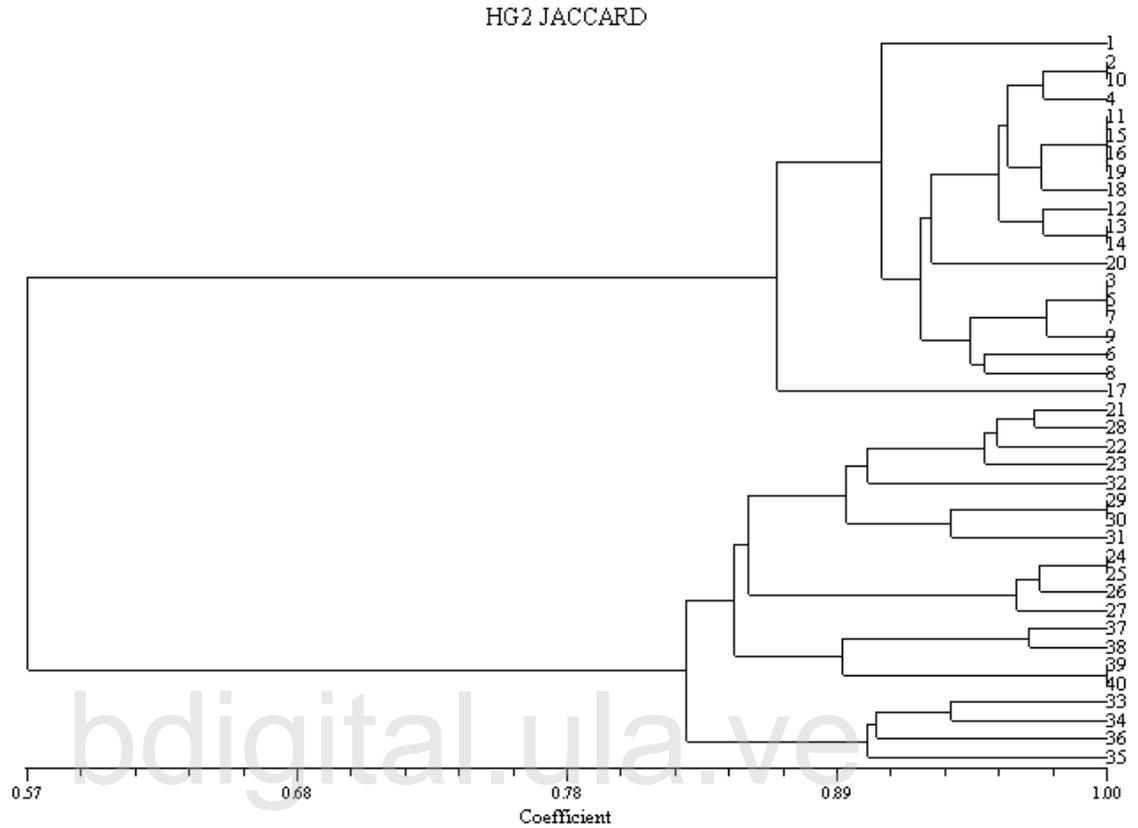
"SAHN: input=C: \JACCARD.NTS, method=UPGMA, tie=WARN
 type=6, size=20 by 2, nc=none



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE DICE PARA HOYA GRANDE (HGZH Y HGZS) CON EL CONJUNTO DE "PRIMERS" UBC: 115-125-135-149



DENODOGRAMA CON EL INDICE DE JACCARD PARA HOYA GRANDE (HGZH Y HGZS) CON EL CONJUNTO DE "PRIMERS" UBC: 115-125-135-149



MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZH CON EL "PRIMER" UBC125

```

"HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
"SIMQUAL: input=C:\C.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
          3 20L 20L 0
          1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
1.0000000
0.9500000 1.0000000
0.9500000 1.0000000 1.0000000
0.9500000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
0.9500000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
0.9500000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
0.9500000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
0.9500000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000
0.9500000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000
0.9500000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000

```

0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000		
0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	
0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
0.9523810	0.9047619	0.9047619	0.9047619	0.9047619	0.9047619
0.9047619					
0.9047619	0.9047619	0.9047619	0.9047619	0.9047619	0.9047619
0.9047619					
0.9047619	0.9047619	1.0000000			
0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	0.9047619	1.0000000		
0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	0.9047619	1.0000000	1.0000000	
0.9500000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000	1.0000000
1.0000000					
1.0000000	1.0000000	0.9047619	1.0000000	1.0000000	1.0000000

**MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZS CON EL "PRIMER"
UBC125**

```

"HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
"SIMQUAL: input=C: \J.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
3 20L 20L 0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
1.0000000
0.9230769 1.0000000
0.9230769 0.8461538 1.0000000
0.8125000 0.7500000 0.7500000 1.0000000

```

0.8125000	0.7500000	0.7500000	1.0000000	1.0000000	
0.7500000	0.6875000	0.6875000	0.9375000	0.9375000	1.0000000
0.7500000	0.6875000	0.6875000	0.9375000	0.9375000	0.8750000
1.0000000					
0.9230769	0.8461538	0.8461538	0.7500000	0.7500000	0.6875000
0.6875000					
1.0000000					
1.0000000	0.9230769	0.9230769	0.8125000	0.8125000	0.7500000
0.7500000					
0.9230769	1.0000000				
1.0000000	0.9230769	0.9230769	0.8125000	0.8125000	0.7500000
0.7500000					
0.9230769	1.0000000	1.0000000			
0.9230769	0.8461538	1.0000000	0.7500000	0.7500000	0.6875000
0.6875000					
0.8461538	0.9230769	0.9230769	1.0000000		
0.8461538	0.7692308	0.9166667	0.6875000	0.6875000	0.7333333
0.6250000					
0.7692308	0.8461538	0.8461538	0.9166667	1.0000000	
0.7857143	0.7142857	0.7142857	0.7500000	0.7500000	0.6875000
0.8000000					
0.7142857	0.7857143	0.7857143	0.7142857	0.6428571	1.0000000
0.8571429	0.7857143	0.7857143	0.8125000	0.8125000	0.7500000
0.8666667					
0.7857143	0.8571429	0.8571429	0.7857143	0.7142857	0.9230769
1.0000000					
0.6428571	0.5714286	0.6923077	0.6250000	0.6250000	0.5625000
0.6666667					
0.5714286	0.6428571	0.6428571	0.6923077	0.6153846	0.8333333
0.7692308					
1.0000000					
0.7333333	0.6666667	0.7857143	0.8125000	0.8125000	0.7500000
0.8666667					
0.6666667	0.7333333	0.7333333	0.7857143	0.7142857	0.7857143
0.8571429					
0.7692308	1.0000000				
0.7857143	0.7142857	0.7142857	0.7500000	0.7500000	0.6875000
0.8000000					
0.7142857	0.7857143	0.7857143	0.7142857	0.6428571	0.7142857
0.7857143					
0.5714286	0.7857143	1.0000000			
0.8461538	0.7692308	0.7692308	0.6875000	0.6875000	0.6250000
0.7333333					
0.7692308	0.8461538	0.8461538	0.7692308	0.6923077	0.7692308
0.8461538					
0.6153846	0.7142857	0.9166667	1.0000000		
0.7857143	0.7142857	0.7142857	0.7500000	0.7500000	0.6875000
0.8000000					
0.7142857	0.7857143	0.7857143	0.7142857	0.6428571	0.7142857
0.7857143					
0.5714286	0.7857143	1.0000000	0.9166667	1.0000000	
0.7857143	0.7142857	0.7142857	0.7500000	0.7500000	0.6875000
0.8000000					
0.7142857	0.7857143	0.7857143	0.7142857	0.6428571	0.7142857
0.7857143					
0.5714286	0.7857143	1.0000000	0.9166667	1.0000000	1.0000000


```

1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
0.8571429 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
0.8571429 0.8571429 0.8571429 0.8571429 0.8571429 0.8571429
0.8571429
1.0000000 0.8571429 0.8571429 0.8571429 0.8571429 0.8571429
0.8571429
0.8571429 0.8571429 0.8571429 0.8571429 0.8571429 1.0000000

```

**MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZS CON EL "PRIMER"
UBC135**

"HOYA GRANDE DOS 12 08 2003

```

"SIMQUAL: input=C: \M.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
3 20L 20L 0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
1.0000000
1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000
0.8333333 0.8333333 0.8333333 0.8333333 0.8333333 0.8333333
0.8333333
0.8333333 0.8333333 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
0.6666667 0.6666667 0.6666667 0.6666667 0.6666667 0.6666667
0.6666667
0.6666667 0.6666667 0.8000000 0.6666667 0.6666667 0.6666667
0.6666667
1.0000000

```

```

1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
0.6666667 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
0.6666667 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
0.6666667 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
0.6666667 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8333333 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
0.6666667 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000

```

MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZH CON EL "PRIMER" UBC149

"HOYA GRANDE TRES 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \G.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
3 20L 20L 0

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
1.0000000
0.6923077 1.0000000
0.7857143 0.7692308 1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000
0.7857143 0.7692308 1.0000000 0.9230769 1.0000000
0.7142857 0.6923077 0.7857143 0.7142857 0.7857143 1.0000000
0.7857143 0.7692308 1.0000000 0.9230769 1.0000000 0.7857143
1.0000000
0.7857143 0.7692308 1.0000000 0.9230769 1.0000000 0.7857143
1.0000000
1.0000000
0.7857143 0.7692308 1.0000000 0.9230769 1.0000000 0.7857143
1.0000000
1.0000000 1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000 0.9230769 0.7142857
0.9230769
0.9230769 0.9230769 1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000 0.9230769 0.7142857
0.9230769
0.9230769 0.9230769 1.0000000 1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000 0.9230769 0.7142857
0.9230769

```

```

0.9230769 0.9230769 1.0000000 1.0000000 1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000 0.9230769 0.7142857
0.9230769
0.9230769 0.9230769 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000 0.9230769 0.7142857
0.9230769
0.9230769 0.9230769 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000 0.9230769 0.7142857
0.9230769
0.9230769 0.9230769 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000
0.6000000 0.8333333 0.7857143 0.8461538 0.7857143 0.7142857
0.7857143
0.7857143 0.7857143 0.8461538 0.8461538 0.8461538 0.8461538
0.8461538
0.8461538 0.8461538 1.0000000
0.7857143 0.7692308 1.0000000 0.9230769 1.0000000 0.7857143
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.9230769 0.9230769 0.9230769 0.9230769
0.9230769
0.9230769 0.9230769 0.7857143 1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000 0.9230769 0.7142857
0.9230769
0.9230769 0.9230769 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8461538 0.9230769 1.0000000
0.7142857 0.8333333 0.9230769 1.0000000 0.9230769 0.7142857
0.9230769
0.9230769 0.9230769 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 0.8461538 0.9230769 1.0000000 1.0000000

```

**MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZS CON EL "PRIMER"
UBC149**

```

"HOYA GRANDE UNO 12 08 2003
"SIMQUAL: input=C: \N.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
3 20L 20L 0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
1.0000000
1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000
1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000 1.0000000
1.0000000

```


MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE DICE PARA HGZH (2) CON EL CONJUNTO DE "PRIMERS" UBC: 115-125-135-149

```

"HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
"SIMQUAL: input=C: \HGZH2.TXT, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -=
0.00000
3 20L 20L 0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
1.0000000
0.9315068 1.0000000
0.9350649 0.9459459 1.0000000
0.9210526 0.9589041 0.9870130 1.0000000
0.9230769 0.9333333 0.9873418 0.9743590 1.0000000
0.9210526 0.9315068 0.9350649 0.9210526 0.9487179 1.0000000
0.9230769 0.9333333 0.9873418 0.9743590 1.0000000 0.9487179
1.0000000
0.9230769 0.9333333 0.9620253 0.9487179 0.9750000 0.9487179
0.9750000
1.0000000
0.9113924 0.9210526 0.9750000 0.9620253 0.9876543 0.9367089
0.9876543
0.9629630 1.0000000
0.9210526 0.9589041 0.9610390 0.9736842 0.9743590 0.9473684
0.9743590
0.9743590 0.9620253 1.0000000
0.9066667 0.9444444 0.9473684 0.9600000 0.9610390 0.9333333
0.9610390
0.9610390 0.9487179 0.9866667 1.0000000
0.9090909 0.9459459 0.9487179 0.9610390 0.9620253 0.9350649
0.9620253
0.9620253 0.9750000 0.9870130 0.9736842 1.0000000
0.8947368 0.9315068 0.9350649 0.9473684 0.9487179 0.9210526
0.9487179
0.9487179 0.9620253 0.9736842 0.9866667 0.9870130 1.0000000
0.8947368 0.9315068 0.9350649 0.9473684 0.9487179 0.9210526
0.9487179
0.9487179 0.9620253 0.9736842 0.9866667 0.9870130 1.0000000
1.0000000
0.9066667 0.9444444 0.9473684 0.9600000 0.9610390 0.9333333
0.9610390
0.9610390 0.9487179 0.9866667 1.0000000 0.9736842 0.9866667
0.9866667
1.0000000
0.9066667 0.9444444 0.9473684 0.9600000 0.9610390 0.9333333
0.9610390
0.9610390 0.9487179 0.9866667 1.0000000 0.9736842 0.9866667
0.9866667
1.0000000 1.0000000
0.8684211 0.9041096 0.8831169 0.8947368 0.8717949 0.8684211
0.8717949
0.8717949 0.8607595 0.8947368 0.9066667 0.8831169 0.8947368
0.8947368
0.9066667 0.9066667 1.0000000
0.9210526 0.9315068 0.9610390 0.9473684 0.9743590 0.9473684
0.9743590
0.9743590 0.9620253 0.9736842 0.9866667 0.9610390 0.9736842
0.9736842

```

```

0.9866667 0.9866667 0.8947368 1.0000000
0.9066667 0.9444444 0.9473684 0.9600000 0.9610390 0.9333333
0.9610390
0.9610390 0.9487179 0.9866667 1.0000000 0.9736842 0.9866667
0.9866667
1.0000000 1.0000000 0.9066667 0.9866667 1.0000000
0.8831169 0.9189189 0.9230769 0.9350649 0.9367089 0.9090909
0.9367089
0.9620253 0.9250000 0.9610390 0.9736842 0.9487179 0.9610390
0.9610390
0.9736842 0.9736842 0.8831169 0.9610390 0.9736842 1.0000000

```

MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZH (2) CON EL CONJUNTO DE "PRIMERS" UBC: 115-125-135-149

```

"HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
"SIMQUAL: input=C: \HGZH2.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -=
0.00000
3 20L 20L 0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
1.0000000
0.8717949 1.0000000
0.8780488 0.8974359 1.0000000
0.8536585 0.9210526 0.9743590 1.0000000
0.8571429 0.8750000 0.9750000 0.9500000 1.0000000
0.8536585 0.8717949 0.8780488 0.8536585 0.9024390 1.0000000
0.8571429 0.8750000 0.9750000 0.9500000 1.0000000 0.9024390
1.0000000
0.8571429 0.8750000 0.9268293 0.9024390 0.9512195 0.9024390
0.9512195
1.0000000
0.8372093 0.8536585 0.9512195 0.9268293 0.9756098 0.8809524
0.9756098
0.9285714 1.0000000
0.8536585 0.9210526 0.9250000 0.9487179 0.9500000 0.9000000
0.9500000
0.9500000 0.9268293 1.0000000
0.8292683 0.8947368 0.9000000 0.9230769 0.9250000 0.8750000
0.9250000
0.9250000 0.9024390 0.9736842 1.0000000
0.8333333 0.8974359 0.9024390 0.9250000 0.9268293 0.8780488
0.9268293
0.9268293 0.9512195 0.9743590 0.9487179 1.0000000
0.8095238 0.8717949 0.8780488 0.9000000 0.9024390 0.8536585
0.9024390
0.9024390 0.9268293 0.9487179 0.9736842 0.9743590 1.0000000
0.8095238 0.8717949 0.8780488 0.9000000 0.9024390 0.8536585
0.9024390
0.9024390 0.9268293 0.9487179 0.9736842 0.9743590 1.0000000
1.0000000
0.8292683 0.8947368 0.9000000 0.9230769 0.9250000 0.8750000
0.9250000
0.9250000 0.9024390 0.9736842 1.0000000 0.9487179 0.9736842
0.9736842
1.0000000

```

0.8292683	0.8947368	0.9000000	0.9230769	0.9250000	0.8750000
0.9250000					
0.9250000	0.9024390	0.9736842	1.0000000	0.9487179	0.9736842
0.9736842					
1.0000000	1.0000000				
0.7674419	0.8250000	0.7906977	0.8095238	0.7727273	0.7674419
0.7727273					
0.7727273	0.7555556	0.8095238	0.8292683	0.7906977	0.8095238
0.8095238					
0.8292683	0.8292683	1.0000000			
0.8536585	0.8717949	0.9250000	0.9000000	0.9500000	0.9000000
0.9500000					
0.9500000	0.9268293	0.9487179	0.9736842	0.9250000	0.9487179
0.9487179					
0.9736842	0.9736842	0.8095238	1.0000000		
0.8292683	0.8947368	0.9000000	0.9230769	0.9250000	0.8750000
0.9250000					
0.9250000	0.9024390	0.9736842	1.0000000	0.9487179	0.9736842
0.9736842					
1.0000000	1.0000000	0.8292683	0.9736842	1.0000000	
0.7906977	0.8500000	0.8571429	0.8780488	0.8809524	0.8333333
0.8809524					
0.9268293	0.8604651	0.9250000	0.9487179	0.9024390	0.9250000
0.9250000					
0.9487179	0.9487179	0.7906977	0.9250000	0.9487179	1.0000000

MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE DICE PARA HGZS (6) CON EL CONJUNTO DE "PRIMERS" UBC: 115-125-135-149

"HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
 "SIMQUAL: input=C: \HGZH2.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000
 3 20L 20L 0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1.0000000																			
0.8717949	1.0000000																		
0.8780488	0.8974359	1.0000000																	
0.8536585	0.9210526	0.9743590	1.0000000																
0.8571429	0.8750000	0.9750000	0.9500000	1.0000000															
0.8536585	0.8717949	0.8780488	0.8536585	0.9024390	1.0000000														
0.8571429	0.8750000	0.9750000	0.9500000	1.0000000	0.9024390														
1.0000000																			
0.8571429	0.8750000	0.9268293	0.9024390	0.9512195	0.9024390														
0.9512195																			
1.0000000																			
0.8372093	0.8536585	0.9512195	0.9268293	0.9756098	0.8809524														
0.9756098																			
0.9285714	1.0000000																		
0.8536585	0.9210526	0.9250000	0.9487179	0.9500000	0.9000000														
0.9500000																			
0.9500000	0.9268293	1.0000000																	
0.8292683	0.8947368	0.9000000	0.9230769	0.9250000	0.8750000														
0.9250000																			
0.9250000	0.9024390	0.9736842	1.0000000																

```

0.8333333 0.8974359 0.9024390 0.9250000 0.9268293 0.8780488
0.9268293
0.9268293 0.9512195 0.9743590 0.9487179 1.0000000
0.8095238 0.8717949 0.8780488 0.9000000 0.9024390 0.8536585
0.9024390
0.9024390 0.9268293 0.9487179 0.9736842 0.9743590 1.0000000
0.8095238 0.8717949 0.8780488 0.9000000 0.9024390 0.8536585
0.9024390
0.9024390 0.9268293 0.9487179 0.9736842 0.9743590 1.0000000
1.0000000
0.8292683 0.8947368 0.9000000 0.9230769 0.9250000 0.8750000
0.9250000
0.9250000 0.9024390 0.9736842 1.0000000 0.9487179 0.9736842
0.9736842
1.0000000
0.8292683 0.8947368 0.9000000 0.9230769 0.9250000 0.8750000
0.9250000
0.9250000 0.9024390 0.9736842 1.0000000 0.9487179 0.9736842
0.9736842
1.0000000 1.0000000
0.7674419 0.8250000 0.7906977 0.8095238 0.7727273 0.7674419
0.7727273
0.7727273 0.7555556 0.8095238 0.8292683 0.7906977 0.8095238
0.8095238
0.8292683 0.8292683 1.0000000
0.8536585 0.8717949 0.9250000 0.9000000 0.9500000 0.9000000
0.9500000
0.9500000 0.9268293 0.9487179 0.9736842 0.9250000 0.9487179
0.9487179
0.9736842 0.9736842 0.8095238 1.0000000
0.8292683 0.8947368 0.9000000 0.9230769 0.9250000 0.8750000
0.9250000
0.9250000 0.9024390 0.9736842 1.0000000 0.9487179 0.9736842
0.9736842
1.0000000 1.0000000 0.8292683 0.9736842 1.0000000
0.7906977 0.8500000 0.8571429 0.8780488 0.8809524 0.8333333
0.8809524
0.9268293 0.8604651 0.9250000 0.9487179 0.9024390 0.9250000
0.9250000
0.9487179 0.9487179 0.7906977 0.9250000 0.9487179 1.0000000

```

MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE JACCARD PARA HGZS (6) CON EL CONJUNTO DE "PRIMERS" UBC: 115-125-135-149

"HOYA GRANDE SEIS 12 08 2003

"SIMQUAL: input=C: \HGZS6.TXT, coeff=J, By Cols, += 1.00000, -= 0.00000

3 20L 20L 0

```

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
1.0000000
0.9696970 1.0000000
0.9696970 0.9393939 1.0000000
0.9166667 0.8888889 0.8888889 1.0000000
0.8918919 0.8648649 0.8648649 0.9729730 1.0000000
0.8888889 0.8611111 0.8611111 0.9722222 0.9459459 1.0000000
0.8888889 0.8611111 0.8611111 0.9722222 0.9459459 0.9444444
1.0000000

```

0.9696970	0.9393939	0.9393939	0.8888889	0.8648649	0.8611111
0.8611111					
1.0000000					
0.8181818	0.7878788	0.7878788	0.7500000	0.7297297	0.7222222
0.7222222					
0.7878788	1.0000000				
0.8181818	0.7878788	0.7878788	0.7500000	0.7297297	0.7222222
0.7222222					
0.7878788	1.0000000	1.0000000			
0.8181818	0.7878788	0.8437500	0.7500000	0.7297297	0.7222222
0.7222222					
0.7878788	0.9285714	0.9285714	1.0000000		
0.8787879	0.8484848	0.9062500	0.8055556	0.7837838	0.8285714
0.7777778					
0.8484848	0.8064516	0.8064516	0.8666667	1.0000000	
0.7058824	0.6764706	0.6764706	0.6944444	0.6756757	0.6666667
0.7142857					
0.6764706	0.8571429	0.8571429	0.7931034	0.6875000	1.0000000
0.7941176	0.7647059	0.7647059	0.7777778	0.7567568	0.7500000
0.8000000					
0.7647059	0.8965517	0.8965517	0.8965517	0.7812500	0.8928571
1.0000000					
0.6764706	0.6470588	0.6969697	0.6666667	0.6486486	0.6388889
0.6857143					
0.6470588	0.8214286	0.8214286	0.8214286	0.7096774	0.8846154
0.8571429					
1.0000000					
0.7142857	0.6857143	0.7352941	0.7500000	0.7297297	0.7222222
0.7714286					
0.6857143	0.8620690	0.8620690	0.8620690	0.7500000	0.8571429
0.8965517					
0.8888889	1.0000000				
0.8823529	0.8529412	0.8529412	0.8611111	0.8378378	0.8333333
0.8857143					
0.8529412	0.7575758	0.7575758	0.7575758	0.8181818	0.6969697
0.7878788					
0.6666667	0.7575758	1.0000000			
0.9090909	0.8787879	0.8787879	0.8333333	0.8108108	0.8055556
0.8571429					
0.8787879	0.7812500	0.7812500	0.7812500	0.8437500	0.7187500
0.8125000					
0.6875000	0.7272727	0.9677419	1.0000000		
0.7428571	0.7142857	0.7142857	0.7297297	0.7567568	0.7027027
0.7500000					
0.7142857	0.8333333	0.8333333	0.7741935	0.7272727	0.7666667
0.8064516					
0.7333333	0.8333333	0.8437500	0.8125000	1.0000000	
0.7428571	0.7142857	0.7142857	0.7297297	0.7567568	0.7027027
0.7500000					
0.7142857	0.8333333	0.8333333	0.7741935	0.7272727	0.7666667
0.8064516					
0.7333333	0.8333333	0.8437500	0.8125000	1.0000000	1.0000000

**MATRIZ DE SIMILITUD CON EL INDICE DE DICE PARA HOYA GRANDE (HGZH y HGZS)
CON EL CONJUNTO DE "PRIMERS" UBC: 115-125-135-149**

```

"HOYA GRANDE DOS 12 08 2003
"SIMQUAL: input=C: \HG2.NTS, coeff=DICE, By Cols, += 1.00000, -=
0.00000
3 40L 40L 0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
28
29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
1.0000000
0.9315068 1.0000000
0.9350649 0.9459459 1.0000000
0.9210526 0.9589041 0.9870130 1.0000000
0.9230769 0.9333333 0.9873418 0.9743590 1.0000000
0.9210526 0.9315068 0.9350649 0.9210526 0.9487179 1.0000000
0.9230769 0.9333333 0.9873418 0.9743590 1.0000000 0.9487179
1.0000000
0.9230769 0.9333333 0.9620253 0.9487179 0.9750000 0.9487179
0.9750000
1.0000000
0.9113924 0.9210526 0.9750000 0.9620253 0.9876543 0.9367089
0.9876543
0.9629630 1.0000000
0.9210526 0.9589041 0.9610390 0.9736842 0.9743590 0.9473684
0.9743590
0.9743590 0.9620253 1.0000000
0.9066667 0.9444444 0.9473684 0.9600000 0.9610390 0.9333333
0.9610390
0.9610390 0.9487179 0.9866667 1.0000000
0.9090909 0.9459459 0.9487179 0.9610390 0.9620253 0.9350649
0.9620253
0.9620253 0.9750000 0.9870130 0.9736842 1.0000000
0.8947368 0.9315068 0.9350649 0.9473684 0.9487179 0.9210526
0.9487179
0.9487179 0.9620253 0.9736842 0.9866667 0.9870130 1.0000000
0.8947368 0.9315068 0.9350649 0.9473684 0.9487179 0.9210526
0.9487179
0.9487179 0.9620253 0.9736842 0.9866667 0.9870130 1.0000000
1.0000000
0.9066667 0.9444444 0.9473684 0.9600000 0.9610390 0.9333333
0.9610390
0.9610390 0.9487179 0.9866667 1.0000000 0.9736842 0.9866667
0.9866667
1.0000000
0.9066667 0.9444444 0.9473684 0.9600000 0.9610390 0.9333333
0.9610390
0.9610390 0.9487179 0.9866667 1.0000000 0.9736842 0.9866667
0.9866667
1.0000000
1.0000000
0.8684211 0.9041096 0.8831169 0.8947368 0.8717949 0.8684211
0.8717949
0.8717949 0.8607595 0.8947368 0.9066667 0.8831169 0.8947368
0.8947368
0.9066667 0.9066667 1.0000000
0.9210526 0.9315068 0.9610390 0.9473684 0.9743590 0.9473684
0.9743590

```

0.9743590	0.9620253	0.9736842	0.9866667	0.9610390	0.9736842
0.9736842					
0.9866667	0.9866667	0.8947368	1.0000000		
0.9066667	0.9444444	0.9473684	0.9600000	0.9610390	0.9333333
0.9610390					
0.9610390	0.9487179	0.9866667	1.0000000	0.9736842	0.9866667
0.9866667					
1.0000000	1.0000000	0.9066667	0.9866667	1.0000000	
0.8831169	0.9189189	0.9230769	0.9350649	0.9367089	0.9090909
0.9367089					
0.9620253	0.9250000	0.9610390	0.9736842	0.9487179	0.9610390
0.9610390					
0.9736842	0.9736842	0.8831169	0.9610390	0.9736842	1.0000000
0.6944444	0.7246377	0.7123288	0.7222222	0.7297297	0.6944444
0.7297297					
0.7027027	0.7466667	0.7222222	0.7042254	0.7397260	0.7222222
0.7222222					
0.7042254	0.7042254	0.7222222	0.6944444	0.7042254	0.7123288
1.0000000					
0.7123288	0.7428571	0.7297297	0.7397260	0.7466667	0.7123288
0.7466667					
0.7200000	0.7631579	0.7397260	0.7222222	0.7567568	0.7397260
0.7397260					
0.7222222	0.7222222	0.7397260	0.7123288	0.7222222	0.7297297
0.9855072					
1.0000000					
0.6760563	0.7058824	0.6944444	0.7042254	0.7123288	0.6760563
0.7123288					
0.6849315	0.7297297	0.7042254	0.6857143	0.7222222	0.7042254
0.7042254					
0.6857143	0.6857143	0.7042254	0.6760563	0.6857143	0.6944444
0.9850746					
0.9705882	1.0000000				
0.7466667	0.7777778	0.7631579	0.7733333	0.7792208	0.7466667
0.7792208					
0.7532468	0.7948718	0.7733333	0.7567568	0.7894737	0.7733333
0.7733333					
0.7567568	0.7567568	0.7733333	0.7466667	0.7567568	0.7631579
0.9577465					
0.9722222	0.9428571	1.0000000			
0.7631579	0.7671233	0.7792208	0.7894737	0.7948718	0.7368421
0.7948718					
0.7692308	0.8101266	0.7894737	0.7733333	0.8051948	0.7894737
0.7894737					
0.7733333	0.7733333	0.7631579	0.7631579	0.7733333	0.7792208
0.9444444					
0.9589041	0.9295775	0.9866667	1.0000000		
0.7567568	0.7887324	0.7733333	0.7837838	0.7894737	0.7567568
0.7894737					
0.7631579	0.8051948	0.7837838	0.7671233	0.8000000	0.7837838
0.7837838					
0.7671233	0.7671233	0.7837838	0.7567568	0.7671233	0.7733333
0.9428571					
0.9577465	0.9275362	0.9863014	0.9729730	1.0000000	
0.7123288	0.7428571	0.7297297	0.7397260	0.7466667	0.7123288
0.7466667					

0.7200000	0.7631579	0.7397260	0.7222222	0.7567568	0.7397260
0.7397260					
0.7222222	0.7222222	0.7397260	0.7123288	0.7222222	0.7297297
0.9275362					
0.9428571	0.9117647	0.9722222	0.9589041	0.9577465	1.0000000
0.6944444	0.7246377	0.7123288	0.7222222	0.7297297	0.6944444
0.7297297					
0.7027027	0.7466667	0.7222222	0.7042254	0.7397260	0.7222222
0.7222222					
0.7042254	0.7042254	0.7222222	0.6944444	0.7042254	0.7123288
1.0000000					
0.9855072	0.9850746	0.9577465	0.9444444	0.9428571	0.9275362
1.0000000					
0.6461538	0.6774194	0.6666667	0.6769231	0.6865672	0.6461538
0.6865672					
0.6567164	0.7058824	0.6769231	0.6562500	0.6969697	0.6769231
0.6769231					
0.6562500	0.6562500	0.6153846	0.6461538	0.6562500	0.6363636
0.8852459					
0.8709677	0.8666667	0.8437500	0.8307692	0.8253968	0.8064516
0.8852459					
1.0000000					
0.5937500	0.6229508	0.6153846	0.6250000	0.6363636	0.5937500
0.6363636					
0.6060606	0.6567164	0.6250000	0.6031746	0.6461538	0.6250000
0.6250000					
0.6031746	0.6031746	0.6250000	0.5937500	0.6031746	0.5846154
0.8666667					
0.8524590	0.8474576	0.8253968	0.8125000	0.8064516	0.8196721
0.8666667					
0.9433962	1.0000000				
0.5846154	0.6129032	0.6060606	0.6153846	0.6268657	0.5846154
0.6268657					
0.5970149	0.6470588	0.6153846	0.5937500	0.6363636	0.6153846
0.6153846					
0.5937500	0.5937500	0.6153846	0.5846154	0.5937500	0.5757576
0.8852459					
0.8709677	0.9000000	0.8437500	0.8307692	0.8253968	0.8387097
0.8852459					
0.9259259	0.9433962	1.0000000			
0.6567164	0.6875000	0.6764706	0.6865672	0.6956522	0.6567164
0.6956522					
0.6666667	0.7142857	0.6865672	0.6666667	0.7058824	0.6865672
0.6865672					
0.6666667	0.6666667	0.6865672	0.6567164	0.6666667	0.6470588
0.9206349					
0.9062500	0.9354839	0.8787879	0.8656716	0.8923077	0.8750000
0.9206349					
0.8571429	0.8727273	0.9285714	1.0000000		
0.6349206	0.6333333	0.6250000	0.6349206	0.6461538	0.6349206
0.6461538					
0.6153846	0.6666667	0.6349206	0.6129032	0.6562500	0.6349206
0.6349206					
0.6129032	0.6129032	0.5714286	0.6031746	0.6129032	0.5937500
0.8135593					
0.8000000	0.7931034	0.8064516	0.7936508	0.7868852	0.8333333
0.8135593					

0.9230769	0.9019608	0.8846154	0.8148148	1.0000000	
0.6268657	0.6562500	0.6470588	0.6567164	0.6666667	0.6268657
0.6666667					
0.6376812	0.6857143	0.6567164	0.6363636	0.6764706	0.6567164
0.6567164					
0.6363636	0.6363636	0.6567164	0.6268657	0.6363636	0.6176471
0.8888889					
0.8750000	0.8709677	0.8787879	0.8656716	0.8615385	0.8750000
0.8888889					
0.9285714	0.9090909	0.9285714	0.8620690	0.9259259	1.0000000
0.5901639	0.6206897	0.6129032	0.6229508	0.6031746	0.5573770
0.6031746					
0.5714286	0.6250000	0.5901639	0.5666667	0.6129032	0.5901639
0.5901639					
0.5666667	0.5666667	0.5901639	0.5573770	0.5666667	0.5483871
0.7719298					
0.7586207	0.7857143	0.7666667	0.7540984	0.7457627	0.7931034
0.7719298					
0.8800000	0.8979592	0.8800000	0.8076923	0.9166667	0.8846154
1.0000000					
0.6153846	0.6451613	0.6363636	0.6461538	0.6567164	0.6153846
0.6567164					
0.6268657	0.6764706	0.6461538	0.6250000	0.6666667	0.6461538
0.6461538					
0.6250000	0.6250000	0.6153846	0.6153846	0.6250000	0.6060606
0.8196721					
0.8387097	0.8333333	0.8437500	0.8307692	0.8253968	0.8709677
0.8196721					
0.8888889	0.9056604	0.9259259	0.8571429	0.9230769	0.9285714
0.9200000					
1.0000000					
0.6571429	0.7164179	0.7042254	0.7142857	0.7222222	0.6857143
0.7222222					
0.6944444	0.7397260	0.7142857	0.6956522	0.7323944	0.7142857
0.7142857					
0.6956522	0.6956522	0.6857143	0.6857143	0.6956522	0.7042254
0.9393939					
0.9552239	0.9230769	0.9275362	0.9142857	0.9117647	0.9253731
0.9393939					
0.8474576	0.8275862	0.8474576	0.8852459	0.8070175	0.8852459
0.7636364					
0.8474576	1.0000000				
0.6376812	0.6969697	0.6857143	0.6956522	0.7042254	0.6666667
0.7042254					
0.6760563	0.7222222	0.6956522	0.6764706	0.7142857	0.6956522
0.6956522					
0.6764706	0.6764706	0.6666667	0.6666667	0.6764706	0.6857143
0.9538462					
0.9393939	0.9375000	0.9117647	0.8985507	0.8955224	0.9090909
0.9538462					
0.8620690	0.8421053	0.8620690	0.9000000	0.8214286	0.9000000
0.7777778					
0.8275862	0.9841270	1.0000000			
0.6567164	0.6875000	0.7058824	0.7164179	0.7246377	0.6567164
0.7246377					
0.6956522	0.7428571	0.7164179	0.6969697	0.7352941	0.7164179
0.7164179					

0.6969697	0.6969697	0.6268657	0.6865672	0.6969697	0.6764706
0.8571429					
0.8750000	0.8387097	0.8484848	0.8656716	0.8307692	0.8437500
0.8571429					
0.8928571	0.8727273	0.8571429	0.8275862	0.8518519	0.8965517
0.8076923					
0.8928571	0.9180328	0.9000000	1.0000000		
0.6567164	0.6875000	0.7058824	0.7164179	0.7246377	0.6567164
0.7246377					
0.6956522	0.7428571	0.7164179	0.6969697	0.7352941	0.7164179
0.7164179					
0.6969697	0.6969697	0.6268657	0.6865672	0.6969697	0.6764706
0.8571429					
0.8750000	0.8387097	0.8484848	0.8656716	0.8307692	0.8437500
0.8571429					
0.8928571	0.8727273	0.8571429	0.8275862	0.8518519	0.8965517
0.8076923					
0.8928571	0.9180328	0.9000000	1.0000000	1.0000000	

bdigital.ula.ve

NTSYS-pc

Taxonomía Numérica y Sistemas de Análisis Multivariado

Versión 1.60

NTSYS-pc es un sistema de programas usado para buscar y desplegar estructuras de datos multivariados. El programa fue originalmente desarrollado para usarlo en el campo de la biología bajo el contexto de la taxonomía numérica (lo cual explica el porqué el nombre del programa es NTSYS- por Sistema Taxonómico Numérico); pero el programa tiene aplicaciones en otras disciplinas de las ciencias naturales, ingeniería, y humanidades.

Dentro del campo de la sistemática biológica, se distinguen dos enfoques fundamentalmente diferentes:

1. - El método Fenético (estudio del fenotipo): Método libre de cualquier teoría, se fundamenta en el uso del mayor número de caracteres posibles (variables) que a priori tienen el mismo peso, e intenta cuantificar los datos, para evaluar la similitud o disimilitud global de organismos, estableciendo grupos clasificados y ordenados lo mas objetivamente posible. Se basa en la creación de taxones a partir de medidas de tipo fenético. Se obtienen fenogramas que indican la semejanza fenotípica de los organismos (Sokal & Sneath, 1963; Sneath & Sokal, 1973).

También es llamada Taxonomía Numérica, y consiste en el descubrimiento y descripción de los patrones de la diversidad biológica, presentados en un “set” de datos multivariados. Este método es comúnmente usado en estudios morfométricos, donde se aplican varios métodos estadísticos a un “set” de datos. La mayoría de los programas encontrados en el NTSYS-pc, están asociados a estudios en el campo del método Fenético.

2. - El método Filogenético: Consiste en la inferencia de la historia evolutiva de las especies bajo la premisa de que tienen un conjunto de caracteres en común que lo distinguen de otro grupo de especies o géneros, similitudes reflejadas a través de árboles filogenéticos de los organismos bajo estudio. Los programas especializados en el método filogenético encontrados en el NTSYS-pc son el PAUP y el PHYLIP, incluido el método “neighbor-joining” (Saitou & Nei’s, 1987) para la determinación de la estimación del árbol filogenético.

La mayoría de estas técnicas comienzan a trabajarse con una matriz de datos bruta que contiene información acerca de las propiedades (rasgos, caracteres, etc.) de un número de objetos (individuos, especímenes, cuadrantes, OTUs, etc.), que NTSYS-pc computa en varias medidas de similitud o disimilitud entre todos los pares de objetos, resumiendo esta información en términos de un “set” de objetos similares (análisis de “clusters” o conglomerados) o en términos de una disposición espacial en uno o más ejes de coordenadas. (Análisis ordinario o vario

PROGRAMAS DE NTSYS-pc

METODOS	PROGRAMAS
GENERALES	"CONSENSU, COPH, CORRESPON, DCENTER EIGEN FOURIER, MDSCALE , MST, NJOIN, OUTPUT PORJ SAHN, STAND, SVD, TRANSF"
MEDIDAS DE (DI) SIMILITUD.	"SIMGEND, SIMINT, SIMQUAL"
GRAFICOS	"MOD3D, MXCOMP, MXPLOT, TREE DISPLAY"

"CONSENSUS": Computa un árbol consenso para dos o mas árboles, representa la tipología consensos (relaciones de un "subset") de dos o mas árboles. El programa compara árboles producidos por diferentes métodos de "clustering", o para construir un árbol que es resumen de muchos árboles.

"COPH": Produce una matriz de valor cofenético (matriz de valores ultra métricos) a partir de una matriz de árbol (producida, por ej. por el programa **SAHN**). Esta matriz puede ser usada por el programa **MXCOMP** para evaluar la "bondad" de lo

apropiado de un análisis de “cluster” a la matriz de similitud o disimilitud en el cual esta basado.

“EIGEN”: Computa las matrices “eigenvector” y “eigenvalue” a partir de la matriz simétrica de similitud. Este programa puede ser usado para llevar a cabo un análisis de componentes principales o un análisis de coordenadas principales con la matriz “eigenvector”.

“SAHN”: Computa varios algoritmos para el análisis de “cluster” (agrupamiento, conglomerados) que Sneath y Sokal (1973) refieren como: Secuencial/Simultaneas, Aglomerativo/Divisiva, Jerárquica/ No Jerárquica, etc.

“SIMINT”: Computa varios índices de (di) similitud para datos de mediciones cuantitativas.

“TREE DISPLAY”: Despliega una matriz de árbol en formato de fenogramas o cladogramas, a partir del análisis de “cluster”, usando gráficos basados en caracteres o su forma de vídeo.