

DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Mycosphaerella* sp. PROVENIENTES DE PLANTACIONES DE BANANO Y PLÁTANO DE DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA

Irene Perea Arango¹; Esperanza Rodríguez Beltrán¹,
Alegría Saldarriaga Cardona² y Rafael Eduardo Arango Isaza³

RESUMEN

Mycosphaerella fijiensis Morelet, agente causal de la Sigatoka negra, afecta dramáticamente la producción comercial de banano y plátano en la mayoría de las regiones productoras del mundo. En Colombia, la Sigatoka negra se observó por primera vez en 1981 en la zona bananera del Urabá y desde entonces se diseminó a todas las regiones, Atlántico, Pacífico, Centro y Oriente del país. En el 2000 la enfermedad fue encontrada en el Chocó, zona del Pacífico Colombiano cubierta completamente por selva y que presenta cultivos de plátano en pequeñas parcelas al borde del río Atrato, la única vía de acceso a la región. En este trabajo se realizó una prueba molecular de diagnóstico a 21 cepas de *Mycosphaerella* spp. aisladas de diferentes zonas y se estudió la diversidad genética del patógeno en algunas regiones de Colombia utilizando marcadores RAPD's. En total se obtuvieron 26 bandas polimórficas con los cebadores OPM01, OPM5 y OPM20. El análisis de distancias genéticas sugiere que las cepas del Chocó provienen de la zona del Urabá antioqueño y que en la zona de Santa Marta se presenta una subpoblación del patógeno diferente de las cepas del resto del país.

Palabras claves: *Mycosphaerella fijiensis*, Sigatoka negra, RAPDs, diversidad genética.

¹ Investigadora. Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Apartado Postal 629, Irapuato, México. ireneperea@hotmail.com

² Investigadora. Unidad de Biotecnología Vegetal Unalmed. CIB Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB, Medellín, Colombia. erodriguez@cib.org.co

³ Investigadora. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA Regional 4, Rionegro, Colombia. alesaldarriaga@yahoo.com

Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Escuela de Biociencias, Facultad de Ciencias, A.A. 3840, Medellín, Colombia. rafaelarango@epm.net.co

ABSTRACT

MOLECULAR DIAGNOSTIC TEST ON *Mycosphaerella* spp. ISOLATES COLLECTED FROM DIFFERENT PLANTATIONS OF BANANA AND PLANTAINS OF DIFFERENT REGIONS OF COLOMBIA

Mycosphaerella fijiensis Morelet, causal agent of the black Sigatoka, dramatically affects the commercial production of bananas and plantains in most of the world's producing regions. In Colombia, black Sigatoka was observed for the first time in 1981 in the zone of Urabá and since then it has disseminated to all regions, including Atlantic, Pacific, Center and East of the country. In the year 2000 the disease was found in Chocó (colombian pacific) a region covered completely by forest. In this area plantains are cultivated in small plots along the Atrato river which is the only access to the region. In this work we used RAPD's markers to analyze the genetic diversity of 21 *Mycosphaerella* spp. isolates collected from different regions. A total of 26 polymorphic bands were obtained with primers OPM01, OPM5 and OPM20. The analysis of genetic distances suggests that the strains from Chocó belong to the zone of Urabá and those from Santa Marta exist a subpopulation of the pathogen different from that found in other regions of the country.

Key words: *Mycosphaerella fijiensis*, black Sigatoka, RAPDs, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos (*Musa* spp) representan dos de los cultivos más importantes en el mundo (Panis y Tien, 2001) ya que forman parte de la base alimenticia de millones de personas (López, *et al.*, 2000) y constituyen uno de los renglones de exportación más importantes en los trópicos. En Colombia, las Sigatokas negra y amarilla afectan más del 30% del total de las 450.000 hectáreas sembradas en banano y plátano. El uso de fungicidas químicos es la forma más común de controlar estas enfermedades, significando un 30-40% de los costos de producción, además producen trastornos a los ecosistemas y a la salud humana. El primer brote de Sigatoka negra en Centroamérica

fue detectado en La Lima, Honduras en 1972 (Stover y Dickson, 1976), y de allí se dispersó hacia norte y sur, llegando a invadir las plantaciones de Colombia. El primer foco de la enfermedad en el país se presentó en el año de 1981 en la zona bananera del Urabá, Municipio de Apartadó, Antioquia, desde donde se diseminó a la región Atlántica, Pacífica, Centro y Oriente del país (Belalcázar, 1991).

En el año 2000 la enfermedad fue encontrada en pequeñas parcelas de plátano en el Chocó (Pacífico colombiano). Esta región es una zona muy interesante desde el punto de vista agro ecológico pues está cubierta por vegetación de selva tropical húmeda y su única forma de acceso es a través del río Atrato y sus afluentes. El

plátano se cultiva en esta zona en pequeñas parcelas cercanas a caseríos o pequeñas poblaciones sobre el río Atrato. Es particularmente interesante estudiar las rutas de transmisión de la enfermedad pues las parcelas están aisladas por la selva circundante.

La deficiente información acerca de la diversidad genética del patógeno en Colombia, restringe y obstaculiza la generación de modelos de análisis de la estructura poblacional del hongo. Tal estudio es necesario para la formulación de estrategias de control y programas de mejoramiento; por tal razón, los inventarios de poblaciones de *M. fijiensis* se convierten en una herramienta básica para cualquier estudio que esté encaminado al control de la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue la identificación de cepas de *Mycosphaerella* sp. por un método molecular y la caracterización de las mismas a través del uso de marcadores RAPD's (amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN). Este estudio contribuye a entender la dinámica poblacional de especies de estos hongos en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de *M. fijiensis*.

Se utilizaron aislamientos monospóricos de *M. fijiensis* colectados de material foliar infectado de bananos o plátanos en estadíos avanzados de la enfermedad. El muestreo se realizó en diferentes regiones de Colombia (Tabla 1).

Para la obtención de cultivos monospóricos se realizó la descarga de ascosporas a partir de lesiones en hojas infectadas en estadíos avanzados de la enfermedad, sobre agar-agua al 3%. Una ascospora fue recuperada del agar-agua con ayuda de un microscopio y un capilar de vidrio. La ascospora fue cultivada en medio agar papa dextrosa (PDA) a 25°C en oscuridad durante 15-20 días. Posteriormente, el micelio de cada cepa se creció en 150 ml del medio SMV (Sintético Mc. Veigh Morton) (Restrepo y Jiménez, 1980) en erlenmeyer de 500 ml, colocado en un agitador orbital a 100 rpm (revoluciones por minuto) y temperatura ambiente (25-30°C), por 8 a 12 días, dependiendo de la cepa. El micelio de colonias puras del hongo se colectó y secó en

Tabla 1. Origen y número de aislamientos de *Mycosphaerella* spp. evaluados en bananos o plátanos establecidos en diferentes regiones de Colombia.

Lugar de recolección	Número de aislamientos	Planta	Cultivar
Chocó (Quibdó, Tadó y Managrucito)	6	Plátano	Dominico
Magdalena (Santa Marta)	5	Banano	Gran Enano
Antioquia (Urabá Antioqueño)	5	Banano	Gran Enano
Llanos Orientales	4	Plátano	Dominico
Tolima	1	Plátano	Hartón
Total	21		

Cultivos monospóricos y obtención de micelio para pruebas moleculares.

papel filtro Whatman # 1 y se almacenó a -70°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Extracción de ADN

El ADN del hongo se aisló utilizando la metodología de extracción con CTAB (Weising *et al.*, 1991) con algunas modificaciones. Brevemente, el micelio del hongo se maceró completamente en presencia de nitrógeno líquido. Por cada 700 mg de micelio macerado se adicionaron 700 μl de buffer de extracción 2X CTAB (Tris-HCl pH 8.0 100 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM and 2% CTAB) y 4 μl de β -mercaptoetanol y se mezcló bien. La mezcla se incubó en baño maría a 65°C por 45 minutos, luego se adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12.000 rpm (revoluciones por minuto) por 30 min. Recuperado el sobrenadante, el ADN se precipitó adicionando un volumen de isopropanol frío (-20°C) con incubación durante 20 min a -70°C ; posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm por 30 min a 4°C . El precipitado fue lavado dos veces con etanol al 70% y al 90%, centrifugado cada vez a 12.000 rpm por 5 min a 4°C . El ADN fue secado con la ayuda de una centrifuga con bomba de vacío y resuspendido en 50 μl de buffer TE (T_{10}, E_1) (Tris - HCl pH 8,0 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L). El ADN de los diferentes aislamientos fue almacenado a 4°C para su posterior uso en el análisis de RAPD's y microsátelites.

Identificación molecular de especies de *Mycosphaerella fijiensis* y *Mycosphaerella musicola*.

El diagnóstico morfológico de las especies de *Mycosphaerella* se basó en la forma de

la ascospora, la cual es la única estructura fácilmente diferenciable al microscopio cuando se realiza la descarga. Se consideraron ascosporas de *Mycosphaerella* spp. aquellas con la morfología típica de estructuras elípticas, hialinas, usualmente con dos células de 14-20 micras de largo y de 4-6 micras de ancho. Sin embargo, las ascosporas de *M. fijiensis* y *M. musicola* son indistinguibles entre si desde el punto de vista morfológico y por lo tanto para la identificación correcta se recurrió a un método molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la cual utiliza iniciadores diseñados para la identificación específica de cada una de las especies del hongo (Johanson y Jeger 1993). Los iniciadores utilizados fueron: el oligonucleótido MF-137 5'ggc gcc ccc gga ggc cgt cta 3' específico para *M. fijiensis*, el MM-137 5'gcg gcc ccc gga ggt ctc ctt 3' específico para *M. musicola*, cada uno en combinación con el oligonucleótido inespecífico R-635 5' ggt ccg tgt ttc aag acg g 3' que se utilizó junto con cada uno de los específicos en las reacciones (Johanson y Jeger, 1993; Romero, 1999). Cada par de iniciadores R-635-MF137 o MM-R635 amplifican un segmento de la región ITS de *M. fijiensis* y *M. musicola*, respectivamente. Las reacciones de amplificación se efectuaron en 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM de Tris - HCl pH 8,3, adicionando 100 mM de cada nucleótido (dNTP, Promega - Madisson), 25 pM de iniciador 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Promega - California) y aproximadamente 50 ng de ADN total, en un volumen final de 25 μl .

Caracterización de cepas por RAPD's

El ADN de los aislamientos de *M. fijiensis* y *M. musicola* fue amplificado por el método

de RAPD's usando los oligonucleótidos OPM - 1, OPM - 5 y OPM - 20 (primers de 10 mer) de Operon Technologies Inc. (Alameda-California) Los componentes de una reacción típica fueron: buffer de PCR (50 mM KCl y 10 mM Tris - HCl, pH 8,5), 1,5 mM MgCl₂, 100 mM de cada uno de los nucleótidos, dATP, dCTP, dGTP y dCTP (dNTPs Promega-California), 25 pmoles de cada oligonucleótido, 50 ng de ADN y 1,0 unidad de *Taq* ADN polimerasa (Promega-California) en un volumen final de 25 μ l. Se utilizó un control negativo para la PCR consistente en los mismos reactivos pero sin ADN. La amplificación se realizó en un termociclador (Perkin Elmer 9600) con una temperatura inicial de 94°C por 5 min., seguido de 37 ciclos de: 94°C por 1 min.; 36°C por 1 min. y 72°C por 2 min, con un ciclo de extensión final de 5 min. a 72°C. Los productos de las reacciones fueron corridos en un gel de agarosa al 1,2% con bromuro de etidio al 0,1% y observado bajo luz ultravioleta.

Análisis de similitud.

Para la caracterización molecular se construyó una matriz de presencia - ausencia de bandas, la cual se realizó bajo una hoja de cálculo de Microsoft Excel, para luego ser transferida al programa NTSYS pc (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System) versión 2.0 diseñado por F. James Rohlf (1998), el cual permite trabajar con datos cualitativos como los que se presentan en la matriz binaria de presencias y ausencias.

La similaridad entre individuos se calculó por medio del coeficiente de DICE (1945). La matriz de similitud resultante, fue analizada con el método UPGMA (Unweighted

pair-group method, arithmetic average) de agrupamiento para construir un dendograma que facilite la interpretación de las relaciones entre los individuos (Rohlf, 1998)

Análisis de coordenadas principales

Dado que los genotipos estudiados son intraespecíficos, es poco probable que los cambios entre los individuos deriven de un ancestro común, sino que se presenten por eventos concurrentes e independientes, como el desarrollo paralelo, la co-evolución, la adaptación específica o la dispersión clonal. En este caso, los métodos jerárquicos como UPGMA, pueden no resultar adecuados. Por esta razón, es recomendable utilizar métodos de agrupamiento ordinal, no jerárquico, como el análisis de coordenadas principales, derivado del análisis de componentes principales, aplicable a un conjunto de datos binarios, y que tienden a agrupar a los individuos en términos de su varianza. (Bridge y Clarson, 1998; Martínez, 1995). Teniendo en cuenta lo anterior, la matriz de similitud fue sometida a un análisis de coordenadas principales y los puntos obtenidos fueron graficados bidimensionalmente utilizando el programa NTSYS pc.

RESULTADOS

PCR confirmativa.

A nivel de campo, el diagnóstico de *M. fijiensis* y *M. musicola* se dificulta debido a que estas dos especies están muy relacionadas y las diferencias de los síntomas de las enfermedades que ellas producen en

algunas ocasiones no son muy claros. Especialmente cuando se encuentran mezclas de los dos patógenos en una misma planta no es posible darse cuenta de ello solo por la sintomatología. A nivel morfológico, estas especies solo pueden distinguirse por las características de sus conidios y conidiósporos los cuales son a veces difíciles de obtener *in vitro*. Para garantizar entonces, la correcta identificación de los aislamientos utilizados en la caracterización molecular, se emplearon herramientas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) que permitieron determinar de modo eficiente y seguro si un aislamiento corresponde a *M. fijiensis* o *M. musicola*.

Los 21 aislamientos empleados para la caracterización molecular fueron evaluados utilizando la PCR confirmativa, se hallaron veinte aislamientos que correspondían a *M. fijiensis* y un aislamiento de la zona del Tolima se identificó como *M. musicola*. Los

materiales positivos para *M. fijiensis* proceden de zonas de cultivo de plátano o/y banano de Chocó, Urabá, Santa Marta y los Llanos Orientales. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de un aislamiento positivo para *M. fijiensis* y otro aislamiento positivo para *M. musicola*.

Análisis de RAPD's

Los tres oligonucleótidos empleados presentaron bandas altamente polimórficas y patrones reproducibles. En total se obtuvieron 26 bandas, el número total de bandas estuvo en un rango entre 0,5 y 3,0 kb. Doce fragmentos fueron producidos por el primer OPM01 y los oligonucleotidos OPM5 y OPM20 produjeron 7 fragmentos cada uno, la valoración de los patrones RAPDs se realizó a nivel visual a partir de las fotografías obtenidas. En la Figura 2 se pueden apreciar algunas de las bandas con polimorfismo obtenidas con los tres cebadores.

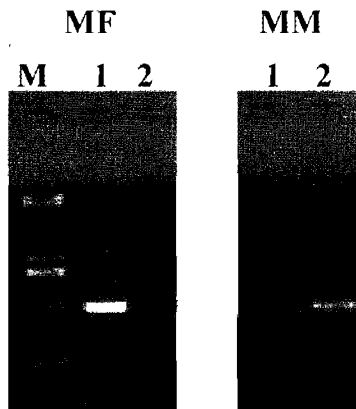


Figura 1. PCR Diagnóstica de especies de *Mycosphaerella*. El panel MF muestra aislamiento positivo para *M. fijiensis*: M, marcadores de peso molecular 1 Kb ladder; carril 1, productos amplificados con par de cebadores R-635-MF137; carril 2, productos amplificados con par de cebadores R-635-MM137. El panel MM muestra aislamiento positivo para *M. musicola*: M, marcadores de peso molecular 1 Kb ladder; carril 1, productos amplificados con par de cebadores R-635-MF137; carril 2, productos amplificados con par de cebadores R-635-MM137

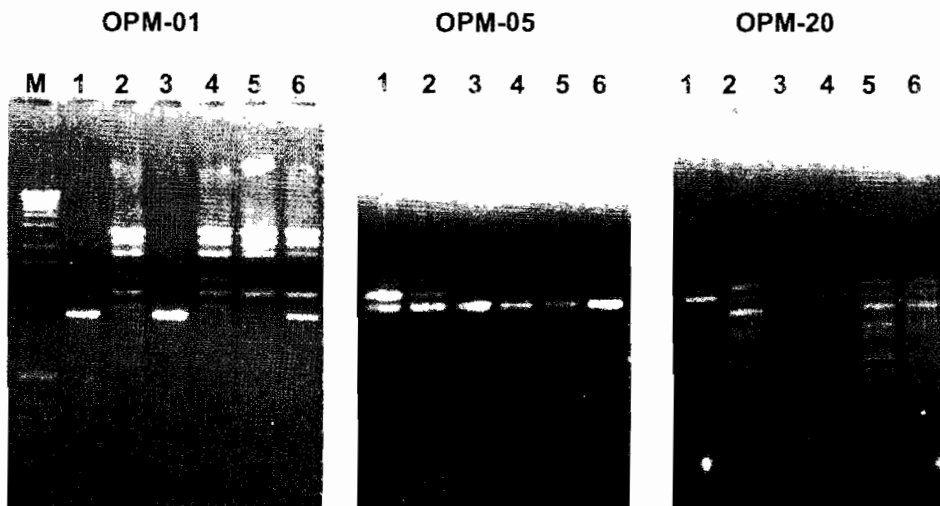


Figura 2. Polimorfismos obtenidos con cebadores OPM-01, OPM-05 y OPM-20. La figura muestra los patrones de bandas obtenidas en 6 cepas de *M. fijiensis*. Cada panel ilustra el respectivo cebador y los carriles 1 a 6 corresponden a amplificadores de 6 aislamientos.

Los polimorfismos obtenidos, producto de los RAPD's, fueron en algunas ocasiones inespecíficos, debido a que se desconoce el sitio de amplificación de los fragmentos de ADN molde. Sin embargo, para realizar el análisis de agrupamiento, solo se consideraron las bandas que se presentaban claramente en los geles y cuya aparición era reproducible.

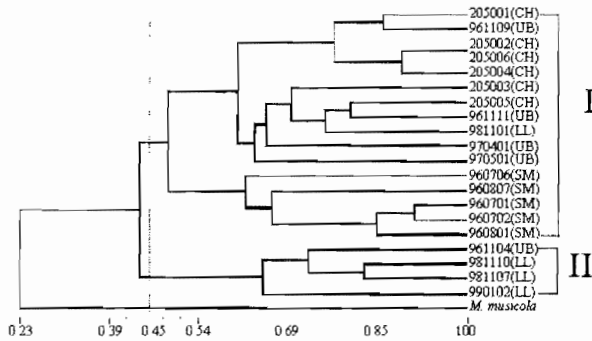
Análisis de distancia genética

Para el análisis de los datos se generó una matriz de distancias, utilizando el índice de similitud de Dice (1945), lo que permitió la clasificación de los genotipos con el método de unión media UPGMA. Realizando un corte a un nivel de similitud del 45% dentro del dendograma se generan 3 grupos o "clusters" 2 de ellos (I y II) con los aislamientos de *M. fijiensis* y un ter-

zero en donde se encuentra el aislamiento de *M. musicola* (Figura 3).

El grupo I estuvo conformado por dos subgrupos, el primero con una similitud de 50%, agrupa las cepas 205001, 205002, 205003, 205004, 205005, y 205006 procedentes del Chocó, las cepa 961109, 961111, 970401 y 970501 de Urabá, los aislamientos 960706, 960607, 960701 960702, 960601 de Santa Marta y un aislamiento de los Llanos Orientales 981101. El segundo subgrupo esta formado por los materiales 981110, 981107 y 990102 de los Llanos Orientales y 961104 de Urabá.

Finalmente, el aislamiento de *M. musicola* presenta una similitud del 23% con respecto al grupo de materiales *M. fijiensis*.



CH:Chocó; UB: Urabá; LL: Llanos Orientales y SM: Santa Marta

Figura 3. Dendrograma de los 21 genotipos de *Mycosphaerella* evaluados con marcadores RAPD's, coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

Agrupamientos por análisis de coordenadas principales

La representación en dos dimensiones del Análisis de Coordenadas Principales (Figura 4) indica la presencia de 3 grupos. En el primero se observa la gran cercanía entre

materiales procedentes del Chocó, Urabá, y Los Llanos Orientales. El segundo grupo está conformado exclusivamente por materiales de Santa Marta y en el tercer grupo se encuentra la cepa de *M. musicola* muy alejada de los grupos de *M. fijiensis*.

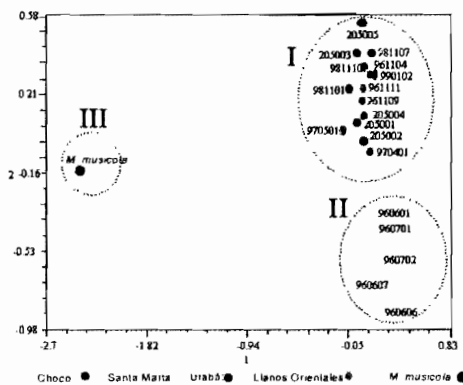


Figura 4. Representación grafica del Análisis de Coordenadas Principales. Para realizar esta grafica la matriz de similitud de los diferentes aislamientos fue sometida a un análisis de coordenadas principales y los puntos obtenidos fueron graficados. El color rojo representa las cepas de *M. fijiensis* provenientes del Chocó; amarillo, Santa Marta; verde, Urabá; azul, Llanos Orientales y morado, Tolima (*M. musicola*).

DISCUSIÓN

PCR confirmativa

Las cepas aisladas de material foliar infectado de las localidades del Chocó (Tadó, Quibdó y Managracito) fueron positivas para *M. fijiensis*, así como todos los aislamientos evaluados de diversas zonas de cultivo del país donde se ha reportado la presencia de la Sigatoka negra. Solo un aislamiento procedente de la zona del Tolima fue positivo para *M. musicola*, zona donde se encuentran presentes ambas especies.

Marcadores RAPD's y análisis de distancia genética

Los marcadores RAPD's utilizados permiten distinguir polimorfismos entre aislamientos con el mismo origen geográfico. Esta variabilidad sugiere que la reproducción sexual juega un papel predominante en el ciclo de vida del patógeno a nivel de campo. Además, estos marcadores nos permiten diferenciar claramente *M. fijiensis* y *M. musicola*, las cuales son muy similares a nivel morfológico.

Los agrupamientos encontrados en los análisis de similitud sugieren la presencia de un gran grupo de aislamientos muy relacionado con las cepas de Urabá y otro grupo que tiende a separarse con cepas de los llanos Orientales. El dendograma también sugiere que la colonización de la Sigatoka negra en el Chocó se realizó a través del intercambio de material infectado tipo semilla, fruta y hojas a nivel fluvial, por el río Atrato, desde la zona del Urabá antioqueño ya que las cepas de estas dos regiones del

país muestran una gran similitud y se agrupan conjuntamente en el análisis de coordenadas principales. Este resultado concuerda con la geografía de la zona caracterizada por estar rodeada por selva con un único medio de conexión: el río Atrato y sus afluentes. Esta conclusión resalta la importancia del intercambio comercial de material infectado, como uno de los principales factores de dispersión de la enfermedad.

En el análisis de coordenadas principales se observan los materiales de Santa Marta aislados del conjunto total de la muestra. Este resultado sugiere que en la región de Santa Marta existe una subpoblación de *M. fijiensis* con características genéticas diferentes a las del resto del país. Sin embargo, el número limitado de muestras analizadas y el bajo número de cebadores empleados no permiten afirmar que la población de Santa Marta sea diferente. Es necesaria la realización de nuevos estudios encaminados a incrementar la información existente de la variabilidad genética y la dinámica de las poblaciones de *M. fijiensis* en el país con un mayor número de aislamientos y cebadores e incluso con otro tipo de marcadores moleculares.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en parte con financiación del Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas (Colciencias), Colombia, Proyecto No. 2213-05-157-97, la Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Maestría en Biotecnología.

BIBLIOGRAFÍA

BELALCAZAR, V. Prevención y Manejo de la Sigatoka negra. *En:* Boletín informativo ICA, 1991. 30 p.

BRIDGE, P.C. and CLARSON, J. Molecular Variability of fungal pathogens. Wallingford, Inglaterra: CAB International, 1998. 319 p.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecological association between species. *En:* Ecology. Vol. 26 (1945); p. 297-302.

JOHANSON A. and JEGER M. Use the PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain *En:* Mycology Research. Vol 97 (1993); p. 670-674.

LÓPEZ, J. *et al.* Establecimiento de suspensiones celulares en plátanos vianda del grupo (AAB). *En:* Biotecnología Vegetal 1(2000); p. 59-62.

MARTÍNEZ, W.O. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en la investigación agrícola. *En:* Agronomía Colombiana. Vol. 12 (1995); p. 66-71.

PANIS, B. y TIEN, T. Criopreservación de germoplasma de Musa. Montpellier, Fran-

cia: Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, 2001. 40 p. (Guías Técnicas INIBAP; no.5).

RESTREPO, A. and JIMÉNEZ, B.E. Growth of paracoccidioides yeast phase in a chemically defined Culture Medium. *En:* Journal of Clinical Microbiology. Vol.12 (1998); p. 279-281.

ROHLF, J.F. NTSYS pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) version 2.0 user guide. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. 1998.

ROMERO, M. *et al.* Diagnóstico para PCR del complejo sigatoka en Colombia. *En:* Revista Facultad Nacional de Agronomía. Vol. 52, No.2 (1999); p. 425-434.

STOVER, R.H. and DICKSON, J. Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis*: a comparison of the first central American epidemics. *En:* FAO Plant Protection Bulletin. Vol. 24 (1976); p. 36-42.

WEISING, K.; KAEMMER, D.; EPPLEN, J.T. and WEIGAND, F. Saxena MC, Kahl G (1991) DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligonucleotidos. *En:* Current Genetics. Vol. 19 (1991); p. 483-489.