

## DIAGNOSTICO POR PCR DEL COMPLEJO SIGATOKA EN COLOMBIA.

Magally Romero<sup>1</sup>, Thais Díaz<sup>1</sup>, Darío Castañeda<sup>1</sup> y Rafael Arango<sup>2</sup>.

---

### RESUMEN

*Las Sigatokas negra y amarilla son enfermedades causadas por *Mycosphaerella fijiensis* y *Mycosphaerella musicola* respectivamente. Estas dos especies de hongos estrechamente relacionadas y morfológicamente similares, causan necrosis severa en las hojas de banano y plátano disminuyendo el área de tejido fotosintético y acelerando la maduración del fruto. Las enfermedades producidas por estos hongos afectan la mayoría de las áreas cultivadas de banano y plátano a nivel mundial, generando un gran problema económico y ambiental.*

*Los síntomas que produce cada uno de estos patógenos en el cultivo son similares, por lo que su correcta identificación en campo se hace difícil. Con el fin de hacer una identificación precisa de cada uno de ellos decidimos estandarizar una prueba diagnóstica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando dos oligonucleótidos de 21 bases (MF 137 y MM 137) específicos para cada una de las especies *M. fijiensis* y *M. musicola* respectivamente. MF 137 y MM 137 codifican regiones variables identificadas en las secuencias interespaciadoras (ITS) del DNA ribosomal.*

*Para el estudio se colectaron muestras de diferentes zonas geográficas del país (Magdalena, Antioquia, Caldas y Tolima), a partir de las cuales se realizaron los aislamientos monoascospóricos. Las ascosporas aisladas se sembraron en medio líquido y a partir de la masa micelial obtenida del cultivo se extrajo el DNA mediante una modificación del método de Raeder & Broda (1985). Este DNA fue amplificado por PCR con ambos tipos de primers MF 137 y MM 137 y el patrón de amplificación sirvió para la clasificación de los aislamientos. De los 45 aislamientos evaluados 44 fueron positivos para *M. fijiensis* y sólo un aislamiento proveniente de Don Matías - Antioquia (960802) fue positivo para *M. musicola*. Los resultados obtenidos muestran la aplicabilidad de la técnica de PCR en la identificación precisa de los agentes causales de las Sigatokas y sugieren que hay un cambio en la distribución del complejo Sigatoka en Colombia, pues *M. fijiensis* se ha reportado tradicionalmente por debajo de los 700 msnm, lo cual indica que es importante realizar un mapa distributivo para ambas enfermedades y la técnica basada en la PCR estandarizada en nuestro laboratorio es una herramienta de gran ayuda para ello.*

---

### ABSTRACT

*Black and Yellow Sigatokas are important diseases affecting bananas and plantains caused by two closely related fungal pathogens: *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola*. The*

---

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología Vegetal. Corporación para Investigaciones Biológicas, CIB. Cra 72A N<sup>o</sup> 78B-141, Medellín. email: cib@epm.net.co

<sup>2</sup> Profesor Asistente, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. e-mail: rarango@col3.telecom.com.co

*correct differentiation between these two pathogens is difficult, since the disease symptoms are very similar and the morphological differentiation in-vitro is hindered by the lack of conidial production of many isolates. We therefore used a PCR technique (Johanson et al 1993,1994 y 1995) to classify monoascosporal isolates collected from different places in Colombia at altitudes ranging from 0 to 1400 mosl. Fungal cultures were incubated in liquid SMV medium for 15 days at 28 °C and DNA was isolated from mycelial tissue after culture, using the method of Reader and Broda (1985). Of the 45 isolates tested one was found to be *M. musicola* and the 44 remaining were *M. fijiensis*, even several isolates coming from places located above 1000 mosl. These results suggest that there is change in the distribution of the Sigatoka diseases in Colombia since *M. fijiensis* has been traditionally considered a pathogen present mainly at altitudes below 700 mosl. We believe that the PCR diagnostic technique could be very useful for monitoring the changes in distribution of these two pathogens.*

---

## INTRODUCCIÓN

El complejo Sigatoka es uno de los principales problemas que más afecta la producción de banano y plátano en Colombia. Esta enfermedad es producida por dos especies de hongos patógenos estrechamente relacionados: *Mycosphaerella musicola*, causante de la Sigatoka amarilla, identificada por primera vez en la isla de Java en 1902 y *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*, agente causal de la Sigatoka negra, descubierta en Honduras en 1972 (Fouré, 1986.).

La Sigatoka negra ha desplazado a la Sigatoka amarilla en muchas zonas bananeras, y se ha diseminado a lo largo de las regiones tropicales de América Latina convirtiéndose en una gran amenaza para los cultivadores de banano y plátano (Stover, 1976 y 1983). La Sigatoka negra es mucho más agresiva que la amarilla pues afecta grandemente el área foliar funcional lo que a su vez reduce significativamente la producción de fruta. En las zonas bananeras y plataneras del país, el control de esta enfermedad es responsable de aproximadamente el 30% de los costos de producción; además, si la enfermedad no fuese controlada la producción se perdería completamente.

En Colombia la Sigatoka negra se detectó por primera vez en octubre de 1981, en la zona bananera de Urabá y desde entonces se ha difundido por las regiones Atlántica, Pacífica, y hacia el centro del país alcanzando los departamentos de Caldas, Cundinamarca y Tolima. Se considera que *M. fijiensis* estaba principalmente distribuido, en zonas por debajo de los 700 metros sobre el nivel del mar y por lo tanto no era motivo de preocupación en algunas zonas plataneras del país. Sin embargo, en el último año se ha reportado en algunos sitios por encima de los mil metros en la zona cafetera del Tolima (Castaño, 1997) y su distribución real no se ha establecido de forma adecuada.

El diagnóstico diferencial entre las dos enfermedades es difícil pues aunque existen síntomas característicos, en algunas ocasiones sus diferencias no son muy claras, especialmente en presencia de los dos patógenos. A nivel de microscopio, los agentes causales de las Sigatokas negra y amarilla se pueden diferenciar solamente en sus estados imperfectos, principalmente por la presencia de una cicatriz en los conidióforos y conidias de *M. fijiensis*, la cual está ausente en *M. musicola* (Meridith, 1970). Sin embargo es difícil obtener este tipo de estructuras, pues son pocos los aislamientos que esporulan *in vitro* en los diferentes medios de cultivo.

Los avances en las técnicas de biología molecular brindan nuevas alternativas para la identificación de hongos fitopatógenos. La técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa

(PCR) (Johanson y Jeger, 1993) permite diferenciar molecularmente *M. fijiensis* de *M. musicola*, de manera rápida y directa, a partir de micelio o de tejido foliar enfermo. Además, el diagnóstico puede realizarse en estadios tempranos de la enfermedad cuando todavía no hay sintomatología clara.

En este artículo se describe el análisis de 45 cepas de *Mycosphaerella* provenientes de diferentes zonas bananeras y plataneras de Colombia. Cada cepa se clasificó por PCR como *M. fijiensis* o *M. musicola*. Además, se reporta la presencia de *M. Fijiensis* a alturas por encima de los mil metros sobre el nivel del mar, indicando un cambio de la distribución geográfica de los agentes causales de las Sigatokas en Colombia.

## MATERIALES Y METODOS

**Aislamiento del hongo.** Los aislamientos del hongo se obtuvieron a partir de hojas de banano o plátano afectadas de Sigatoka negra en estadios 5 o 6, obtenidas de zonas de los departamentos de Magdalena, Antioquia, Caldas y Tolima (Tabla 1). El material se dejó secar completamente y luego se obtuvieron los aislamientos monoascospóricos de la siguiente manera: se cortaron trozos de hojas de 5 cm<sup>2</sup> de superficie y se sumergieron en agua destilada durante 4 horas; luego se pegaron con grapas a papel absorbente húmedo, y se colocaron sobre la tapa de una caja de Petri con agar agua al 0.7% (BBL). Las cajas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. La identificación de los sitios de descarga de ascosporas se hizo luego al microscopio y con un capilar se aisló una ascospora, la cual se cultivó en el medio PDA (Potato dextrosa agar, BBL) a 27°C.

**Extracción del DNA.** El hongo se creció en medio líquido SMV (Sintético Mc Veigh Morton) (Restrepo y Jiménez, 1980) a 27°C durante 8 a 12 días dependiendo de la cepa. El micelio se obtuvo centrifugando el cultivo a 1000 g durante 15 minutos a 4 °C, a partir del cual se extrajo el DNA siguiendo el método descrito por Reader and Broda (1985) con algunas modificaciones como se describe a continuación: el hongo fue macerado completamente en presencia de nitrógeno líquido, se agregó buffer de extracción (200mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS), se incubó a temperatura ambiente por 10 min. y a 65°C por 1h. Posteriormente se hicieron varias extracciones con volúmenes iguales de fenol - cloroformo (1 :1) centrifugando a 10.000 g durante 15 min. a 4°C. Al sobrenadante se le agregó 0.15 unidades de RNasa (USB), se incubó 2h a 37°C, después se adicionó un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a las mismas condiciones. El DNA, se precipitó adicionando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío durante toda la noche a -20°C., al día siguiente se centrifugó 20 min. a 4°C. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 75%. El DNA seco se resuspendió en 50 µl de buffer TE (10mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mM EDTA). En algunas ocasiones el DNA se extrajo directamente de la hoja enferma, siguiendo el mismo procedimiento.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Los oligonucleótidos empleados para la caracterización molecular fueron: MF137 5=GGCGCCCCCGGAGGCCG TCTA3= específico para *M. fijiensis*, y MM137 5= GGCGCCCCCGGAGGTCT CCTT 3= específico para *M. musicola* (Johanson y Jeger, 1993), cada uno de ellos con el primer inespecífico R 635 5=GGTCCGTGTTTCAAGACGG3= que codifica para una región conservada situada en la subunidad 25S del DNA ribosomal (Liu y col, 1991).

Las reacciones se hicieron de la siguiente manera: buffer de PCR (50 mM KCl y 10 mM Tris HCl pH 8.5), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada uno de los nucleótidos, dATP, dCTP, dGTP y dCTP (Promega), 25 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos (MM137 ó MF137 y R 635), 50 ng de DNA y 2.0 unidades de Taq polimerasa (Promega), todo llevado a un volumen final de 50 µl. Se utilizó un control negativo para la PCR que consistió en los mismos reactivos pero sin DNA. La amplificación se realizó en un termociclador (Perkin Elmer 9600) con una temperatura inicial de 95°C por 5 min., seguido de 35 ciclos de: 95°C por 1min.; 65°C por 1 min. y 72°C por 1min., seguidos por 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.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Aislamiento del hongo.** Se realizaron cuarenta y cinco aislamientos de *Mycosphaerella sp.* a partir de hojas infectadas de banano y plátano, en estadios 5 o 6. Las ascosporas se presentan como células hialinas biceldadas con una pequeña constricción en el septo, morfología consistente con la descripción reportada para *M. musicola* y *M. fijiensis* (Mulder and Hollyday 1974 a, b). La germinación de las ascosporas se llevó a cabo a las 24 horas después de la descarga; ésta fue bipolar, con tubos germinativos rectos o ligeramente curvos. Aunque por lo general los aislamientos no producen conidas, se observaron tres aislamientos que produjeron conidias hialinas rectas o ligeramente curvas, con tres a nueve septos. Todas las conidias mostraron la cicatriz característica de *M. fijiensis* en la base del sitio de unión al conidióforo.

Se evidenciaron colonias obtenidas de ascosporas entre 4 a 6 días de incubación sobre PDA a 27 °C bajo luz continua. La morfología de la colonia fue variable entre las cepas: algunas fueron compactas y su color inicialmente fue de una tonalidad gris olivácea y posteriormente se tornaba blanca, rosada o café oscuro según la cepa.

**Extracción del DNA y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** En las extracciones se obtuvo un rendimiento promedio de 36.958 µg de DNA por gramo de micelio, y una concentración final promedio de 0.739 µg/µl.

El DNA extraído de cada cepa fue amplificado con dos pares de primers: el MF137 y R 635 y el MM137 y R 635, con los cuales se clasificó cada aislamiento monoascospórico como *M. fijiensis* o *M. musicola* según el patrón de amplificación. En ambos casos se obtuvo como producto de amplificación una banda de 1018 pb (Figura 1) pero específica para cada juego de primers. En total se clasificaron 45 aislamientos (Tablas 1 y 2).

Nuestros resultados muestran que el método basado en la amplificación de una región del DNA ribosomal es sensible y específico para la clasificación de *M. fijiensis* y *M. musicola*, agentes causales de las Sigatokas negra y amarilla respectivamente (Johanson 1994 y 1995). Se clasificaron cuarenta y cuatro cepas como *M. fijiensis* y solo una cepa (960802) se clasificó como *M. musicola*. El método también fue exitoso para el diagnóstico directo a partir de hojas infectadas, empleándose poca cantidad de muestra.

Estos resultados permiten concluir que la amplificación por PCR empleando los primers específicos para *M. fijiensis* y *M. musicola* constituye una herramienta atractiva para estudios epidemiológicos que permite el diagnóstico temprano de la enfermedad, pues permite determinar la presencia de inóculo en estadios asintomáticos de la enfermedad, contrario a lo encontrado por Aguirre y colaboradores (1998) quienes estandarizaron una metodología para la diferenciación entre *M. fijiensis* y *M. musicola*. Esta última metodología se basa en la realización de una impronta y la identificación de las conidias al microscopio. Aunque la técnica es aparentemente sencilla, tiene la desventaja de que se requiere material infectado en estadios 3 a 4 de la enfermedad. Además, la morfología de las conidias no siempre es muy clara pues se encuentran intermedios entre *M. fijiensis* y *M. musicola*.

**Figura 1.** Productos de amplificación de DNA. Línea 1, marcador de peso molecular 1kb DNA Bibco-BRL. Líneas 2-3, Controles negativos para la PCR. Líneas 4-8 aislamientos de *M. fijiensis* con los oligonucleótidos MF137/R635. Líneas 9-13, los mismos aislamientos anteriores de *M. fijiensis* pero con los oligonucleótidos específicos para *M. musicola* MM137/R635.

**Tabla 1.** Clasificación por PCR con los primers MF137 y MM137 de aislamientos monoascospóricos de *M. fijiensis* y *M. musicola* obtenidos de diferentes zonas geográficas de Colombia.

No.	Código	Clasificación	Origen
	U de A	<i>M. fijiensis</i>	Medellín
1	960101	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
2	960102	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
3	960103	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
4	960201	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
5	960202	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
6	960305	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
7	960501	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
8	960601	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
9	960602	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
10	960604	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
11	960605	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
12	960606	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
13	960607	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
14	960608	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
15	960701	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
16	960702	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
17	960703	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
18	960705	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
19	960706	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
20	960707	<i>M. fijiensis</i>	Santa Marta
21	960802	<i>M. musicola</i>	Don Matías

22	960901	<i>M. fijiensis</i>	Manizales
23	961101	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
24	961103	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
25	961104	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
26	961106	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
27	961107	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
28	961108	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
29	961109	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
30	961110	<i>M. fijiensis</i>	Urabá

Continuación Tabla 1.

No.	Código	Clasificación	Origen
31	961111	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
32	961112	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
33	961113	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
34	961202	<i>M. fijiensis</i>	Fresno
35	961203	<i>M. fijiensis</i>	Fresno
36	970101	<i>M. fijiensis</i>	Montelíbano
37	970102	<i>M. fijiensis</i>	Montelíbano
38	970103	<i>M. fijiensis</i>	Montelíbano
39	970105	<i>M. fijiensis</i>	Montelíbano
40	970106	<i>M. fijiensis</i>	Montelíbano
41	970107	<i>M. fijiensis</i>	Montelíbano
42	970201	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
43	970301	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
44	970401	<i>M. fijiensis</i>	Urabá
45	970501	<i>M. fijiensis</i>	Urabá

**Tabla 2.** Clasificación por PCR de los aislamientos colectados según el lugar de origen.

Lugar	Clasificación		Altitud (msnm)
	<i>M. fijiensis</i>	<i>M. musicola</i>	
Santa Marta	20		500
Manizales	1		2000
Don Matías		1	2000
Fresno	2		1300
Urabá	15		200
Montebello	6		1500

Es importante resaltar que se encontró *M. fijiensis* en muestras procedentes de lugares por encima de los 1000 msnm, lo que indica un avance de la Sigatoka negra hacia las zonas plataneras del país. La distribución real de las dos enfermedades no se conoce con exactitud en Colombia y dada la agresividad de *M. fijiensis* es urgente realizar un mapa de su distribución en todas las regiones colombianas productoras de banano y plátano, lo cual ayudaría a cambiar los esquemas de manejo en las zonas donde se detecte su presencia o la implementación de normas para retardar su llegada.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Dr. Jairo Castaño (Universidad de Caldas), Miguel Mayorga (Novartis, Colombia), grupo GIEM (Universidad de Antioquia), Dra. Betty Newman (Universidad del Magdalena) y a la Unidad de Micología (CIB) por su excelente soporte técnico; a la comercializadora PROBAN, Dr. Jorge Mateus and Dra. Ruby Orozco (CORPOICA) por el suministro de muestras .

### BIBLIOGRAFIA

AGUIRRE, G. M., CASTAÑO ZAPATA, J. y ZULUAGA, A. L. Método rápido de diagnóstico de *Mycosphaerella musicola* Leach y *M. fijiensis* Morelet, agentes causales de la Sigatoka amarilla y Sigatoka negra. *En: Agronomía*. Vol. 8, No. 2 (1998); p.26-30.

CASTAÑO, J. Comunicación personal (Universidad de Caldas, Manizales) 1997.

FOURÉ, E. *In: PERSLEY, G.J.; De LANGHE, E.A., eds. Banana and plantain breeding strategies*. Canberra, Australia: ACIAR, 1986. p. 110-113 ( Proceedings No. 21).

JOHANSON A. *et al.* The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *En: Plant Pathology*. Vol. 43 (1994); p.701-707.

\_\_\_\_\_ and JEGER M. Use the PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. Musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and platain. *En: Mycology Research*. Vol. 97, No. 6 (1993); p.670-674.

\_\_\_\_\_. Detection of banana leaf spot pathogens by PCR. *En: Bulletin OEPP*. Vol.25 (1995); p.99-107.

LIU, Z.; STEWART. E.L. and SZABO, S.J. Phylogenetic relationships among *Cercospora* and allied genera on banana based on rDNA sequence coparisons. *En: Phytopathology*. Vol. 81 (1991); 1240p. (abstr.).

MEREDITH, D.S. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. *Commw. Mycology Institute*, 1970. 144pp.

MULDER, J.L. and HOLLIDAY, P. *Mycosphaerella fijiensis*. *En: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*. N°. 413 (1974a).

MULDER, J.L. and HOLLIDAY, P. *Mycosphaerella musicola*. *En: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*. N°. 414 (1974b).

READER, U. and BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *En: Letters in Applied Microbiology*. No. 1 (1985); p.17-20.

RESTREPO, A y JIMÉNEZ B.E. Growth of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase in a chemically defined culture medium. *En: Journal of Clin. Microbiology*. Vol 12 (1980); p.279-281.

STOVER, R.H. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. *En: Tropical Agriculture (Trinidad)*. Vol. 53 (1976); p.111-114.

STOVER, R.H. The intensive production of the horn type plantains, with coffee in Colombia. *En: Fruits (France)*. Vol. 38, No. 11 (1983): p.756-770.

Recibido: Diciembre 14 de 1998

Aceptado: Marzo 1 de 1999

Diagnóstico por PCR del.....