

VARIABILIDAD MORFOLÓGICA, PATOGENICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Cercospora coffeicola*

Adriana González*; Marcela Fajardo*; Jairo Leguizamón-Caycedo**;
Marco Aurelio Cristancho-Ardila***; Bernardo Chaves-Cordoba****

RESUMEN

GONZÁLEZ, A.; FAJARDO, M.; LEGUIZAMÓN C., J. E.; CRISTANCHO A., M. A.; CHAVES C., B. Variabilidad morfológica, patogénica y molecular de aislamientos de *Cercospora coffeicola*. Cenicafé 51(4):306-315. 2000

Los estudios de variabilidad de patógenos de las plantas permiten conocer su estructura genética y su capacidad de adaptación a diferentes ambientes y de esta manera, orientar las medidas de manejo. Con este propósito se evaluó la variabilidad morfológica, patogénica y molecular de 11 aislamientos de *Cercospora coffeicola* Berk. y Cooke, agente causante de la mancha de hierro del café, provenientes de diversas zonas cafeteras de Colombia, mediante el estudio de sus tasas de crecimiento micelial, pruebas de patogenicidad y técnicas de biología molecular (RAPDs). Se encontraron diferencias entre aislamientos en cuanto al crecimiento del micelio y a la patogenicidad en plántulas, mas no en patogenicidad en frutos y hojas desprendidas. En ningún caso se pudo hacer asociación con el origen geográfico de los aislamientos. Para las pruebas moleculares (RAPDs) se utilizaron 30 iniciadores de secuencia aleatoria de 10 pares de bases, los cuales revelaron profundos polimorfismos entre los diferentes aislamientos.

Palabras claves: Café, mancha de hierro, patógenos, variabilidad genética, RAPDs, polimorfismo.

ABSTRACT

Plant pathogen variability studies allow an insight to their genetic structure and their ability to adapt to different environments, and allow the planning of management measures. The morphological, pathogenic and molecular variability of 11 isolates of *Cercospora coffeicola* Berk.& Cooke, the causal agent of Coffee Iron spot, from different coffe-growing regions in Colombia, were evaluated, using mycelial growth rates, pathogenicity tests, and molecular techniques (RAPD). Differences were observed among isolates regarding mycelial growth rates and pathogenicity in nursery plants, but there were no differences in pathogenicity on excised leaves or berries. No apparent association between the isolates and their geographic origin was found. For molecular tests (RAPD), 30 random-sequence primers (10-mer) were used, indicating deep polymorphism among the isolates studied.

Keywords: Coffee, iron spot, pathogens, variability, RAPDs, polymorphism.

-
- * Estudiantes de Práctica Empresarial en Microbiología. Universidad de Los Andes. Bogotá, Colombia.
** Investigador Principal I. Fitopatología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé, Chinchiná, Caldas, Colombia, hasta mayo de 2000.
*** Asistente de Investigación. Biotecnología. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.
**** Investigador Científico II. Biometría. Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. Chinchiná, Caldas, Colombia.

La Mancha de Hierro del café es una enfermedad cuyo agente causante es el hongo *Cercospora coffeicola* Berk. y Cooke, el cual afecta todas las variedades de café cultivadas en Colombia y es de importancia económica, especialmente bajo condiciones de libre exposición solar y un deficiente estado de nutrición de las plantas.

Según López y Fernández (7), las plantas de café en sus primeros estados de desarrollo permanecen alrededor de 7 meses en los sitios denominados almacigos, antes de ser llevadas al campo para su siembra definitiva. Durante este tiempo las plántulas están sujetas a intensos ataques de la enfermedad cuyos efectos se traducen en una fuerte defoliación. Las lesiones características causadas por *C. coffeicola* se describen como manchas anfígenas (por haz y envés), redondas (de 1 a 3mm de diámetro, aproximadamente), con centro blanco grisáceo circundado por un anillo marginal uniforme de color pardo rojizo o marrón. Frecuentemente se unen varias manchas llegando a cubrir gran parte de la lámina ocasionando el desprendimiento de la hoja (4). En los frutos atacados el pergamino se mancha, la pulpa se pega a los granos y la almendra se deforma (6).

De acuerdo con Fisher citado por McDonald (8), el potencial evolutivo de una población es proporcional a la diversidad genética dentro de la misma. Así, la variabilidad entre individuos de una misma especie fitopatógena permite determinar su capacidad de adaptación, la cual se manifiesta frente a cambios ambientales, uso de fungicidas u otras prácticas de cultivo.

La importancia de los estudios de variabilidad radica en la necesidad de conocer las poblaciones de los patógenos, con el fin de adoptar medidas eficaces de control, que estén dirigidas a la totalidad de la población y no sólo a algunos individuos (8), garantizando así su efectividad a largo plazo. El objetivo final de este tipo de estudios, es encontrar aquellos factores que jue-

gan un papel relevante en la evolución de los patógenos y conocer cómo estas fuerzas evolutivas interactúan para determinar la composición genética y el potencial evolutivo de las poblaciones de patógenos.

La técnica de RAPDs, de fácil utilización, fácil interpretación y bajo costo, permite obtener resultados de un gran número de muestras en un período relativamente corto de tiempo (8). Gracias a estas ventajas y a su versatilidad, la técnica de RAPDs constituye una herramienta importante para la evaluación de la variabilidad genética entre diferentes aislamientos de una misma especie, lo cual puede complementarse con resultados obtenidos en otras pruebas como el crecimiento micelial y la patogenicidad, tanto en hojas desprendidas como en plantas.

El objetivo de esta investigación consistió en determinar la variabilidad morfológica, patogénica y molecular entre 11 aislamientos de *C. coffeicola*, provenientes de diferentes lugares de la zona cafetera de Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en los laboratorios de Biología de Cenicafé en Chinchiná, Caldas, donde prevalecieron condiciones de temperatura en promedio de 20,5°C y humedad relativa entre el 70 y el 80%.

Aislamientos del hongo y condiciones de crecimiento. Los aislamientos de *C. coffeicola* utilizados en este estudio se describen en la Tabla 1. Las hojas y frutos de café afectados por el hongo se lavaron con agua destilada estéril y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2%, durante 30 segundos. El exceso de hipoclorito se lavó con agua destilada estéril y las hojas y frutos se colocaron en cámara húmeda durante 48h, a temperatura ambiente, para inducir la esporulación del hongo.

TABLA 1. Procedencia e identificación de los diferentes aislamientos de *Cercospora coffeicola*.

Aislamiento (meses)	Procedencia	Variedad de café	Órgano de la planta	Edad de la planta
A1	Granja (Caldas)	Colombia	Hoja	3,5
A2	Naranjal (Caldas)	Colombia	Hoja	6
A3	Maracay (Quindío)	Colombia	Hoja	18
A4	Maracay (Quindío)	Colombia	Hoja	21
A5	Supía (Caldas)	Caturra	Hoja	20
A6	Supía (Caldas)	Colombia	Hoja	18
A7	Supía (Caldas)	Colombia	Fruto	18
A8	Pueblo Bello (Cesar)	Colombia	Fruto	30
A9	Pueblo Bello (Cesar)	Colombia	Hoja	30
A10	Santa Bárbara (C/marca)	Caturra	Hoja	48
A11	Convención (N. de Santander)	Colombia	Hoja	5

Los conidióforos característicos de *C. coffeicola* se identificaron al estereoscopio y se transfirieron asépticamente con una aguja de disección a cajas de Petri con medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar en 39 g/L de agua) acidificado a pH 4,0 con ácido láctico al 37%. Las cajas permanecieron en el laboratorio de Fitopatología de Cenicafé a una temperatura ambiente de 20°C. Para verificar las características microscópicas del hongo se registró el tamaño, el color y la forma del conidióforo, así como la forma y el arreglo de las esporas.

Materiales de café. Para las pruebas de patogenicidad en almacigo se utilizaron 66 plantas de *Coffea arabica* variedad Caturra de 2 meses de edad, sembradas en bolsas de polietileno de 17 x 23cm, en suelo sin pulpa y sin adición de fertilizantes.

Crecimiento micelial. Para estandarizar el inóculo, 1g de micelio del hongo, obtenido mediante crecimiento en medio PDA acidificado a un pH de 4,0 con ácido láctico al 37%, se resuspendió en 9ml de agua destilada estéril para así obtener una dilución de 10⁻¹. A partir de ésta, se tomó un inóculo de 10µl para realizar el recuento de la cantidad de micelio infectivo/ml de agua, en una cámara de Neubauer. Se estandarizó un inóculo de 8,0x10⁴ micelio

infectivo/ml de agua del cual se sembraron 10ml asépticamente en cajas con PDA acidificado a pH 4,0 con ácido láctico al 37%, para luego realizar lecturas diarias del diámetro de la colonia (4). Para este experimento se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 11 tratamientos (aislamientos) y 4 repeticiones, donde la variable por evaluar fue el crecimiento diametral diario.

La tasa diaria de crecimiento se estimó mediante un modelo de regresión lineal simple. Así mismo, se determinaron los intervalos de confianza de la velocidad de crecimiento micelial diario entre los diferentes aislamientos de acuerdo a la fórmula:

$$b-t_{1/2}^{gl\ error} Sb; b+t_{1/2}^{gl\ error} Sb.$$

Patogenicidad. Plántulas. Para realizar las pruebas de patogenicidad en el almacigo se inocularon 5 plantas de *C. arabica* var. Caturra a la edad de 2 meses, ubicando el inóculo, 3 gotas de 5ml de una solución estándar de 8,0 x 10⁴ micelio infectivo/ml de agua, en el envés del segundo par de hojas. Las hojas de la planta testigo se inocularon con agua destilada estéril, con el mismo número y tamaño de gotas, como ya se indicó.

Las plantas se mantuvieron durante 48 horas en condiciones de cámara húmeda con una humedad relativa del 100%, temperatura de 22°C en promedio y oscuridad. Luego se colocaron en un almácigo ubicado en Cenicafé, en Chinchiná, donde permanecieron en condiciones de libre exposición solar durante 46 días (7). Para esta prueba se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 11 tratamientos (aislamientos) y 5 repeticiones, cuya unidad experimental estuvo constituida por el segundo par de hojas inoculadas de la planta y la variable a evaluar fue el número de lesiones por hoja. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza y una prueba LSD (Least Significant Difference), para encontrar diferencias en el grado de patogenicidad de los diferentes aislamientos.

Hojas desprendidas. Se realizaron inoculaciones por el envés de 5 hojas desprendidas por aislamiento, utilizando 6 gotas de 10µl de una solución de $8,0 \times 10^4$ micelio infectivo/ml de agua y como control una hoja inoculada con agua destilada estéril para cada tratamiento. Las hojas inoculadas y los testigos se mantuvieron en cámara húmeda, bajo condiciones de laboratorio y de luz constante. Para esta prueba se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 11 tratamientos (aislamientos) y 5 repeticiones cuya unidad experimental fue la hoja de una plántula y la variable por evaluar, el número de lesiones por hoja. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza y la prueba de Bonferroni.

Frutos. Se inocularon 5 frutos pintones desprendidos con el pedúnculo, utilizando dos gotas de 5µl de $8,0 \times 10^4$ micelio infectivo/ml de agua para cada aislamiento. Los frutos se colocaron en cajas de 15x10x4cm que contenían agua, utilizando como base tapas de tubo de ensayo previamente esterilizadas, y se mantuvieron en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 26 días. Para esta prueba se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con 11

tratamientos (aislamientos) y 5 repeticiones, cuya unidad experimental fue el fruto de café y la variable a evaluar el número de lesiones por fruto. Los datos se procesaron mediante un análisis de varianza y la prueba de Bonferroni.

Pruebas moleculares (RAPDs). Los 11 aislamientos de *C. coffeicola* se cultivaron en medio líquido GL (Glucosa-Levadura), durante 7 días y a 28°C, en agitación constante a 120rpm. El ADN se extrajo a partir de micelio liofilizado del hongo utilizando el protocolo de extracción de ADN propuesto por Zolan y Pukkila (11), modificando el buffer y la extracción con cloroformo: isoamilalcohol en proporción 24:1. La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, donde también fue posible observar la presencia de ARN contaminante. El análisis de pureza y la cuantificación del ADN extraído se realizaron mediante espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta a una longitud de onda entre 220 y 320nm.

Para los RAPDs se utilizaron 30 iniciadores de 10 pares de bases de secuencia aleatoria (GIBCO) (Tabla 2), siguiendo esencialmente la metodología descrita por Williams et al. (10). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de 25ml que contenía entre 10 y 100ng de ADN genómico; buffer de reacción 10X (Gibco BRL); dATP, dCTP, dGTP, dTTP 2,5 mM (Gibco BRL); MgCl₂ 25mM (Gibco BRL); iniciador 10mM (Gibco BRL); Taq DNA polimerasa recombinante (5U/ml, Gibco BRL) y agua ultrafiltrada estéril. Las muestras se amplificaron en un termociclador MJ-Research PTC-200 programado para 5min. de denaturalización a 94°C, seguida por 40 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 36°C y 2min a 72°C, y un ciclo final de extensión de 5min a 72°C.

Para garantizar la reproducibilidad y la consistencia de los datos obtenidos, se realizaron tres amplificaciones de todos los aislamientos con cada iniciador y se varió la concentración

TABLA 2. Iniciadores utilizados en la técnica de PCR-RAPDs con cada uno de los aislamientos de *C. coffeicola*.

Iniciador	Secuencia	Iniciador	Secuencia
OPE-01	CCCAAGGTCC	CC8	ACTGGGACTC
OPE-02	GGTGCGGGAA	M10	GTGATCGCAG
OPE-03	CCAGATGCAC	M15	TTCCGAACCC
OPE-08	TCACCACGGT	B02	TGATCCCTGG
OPE-09	CTTCACCCGA	C20	ACTTCGCCAC
OPE-11	GAGTCTCAGG	D18	GAGAGCCAAC
OPE-14	TGCGGCTGAG	PO5	CCCCGGTAAC
OPE-19	ACGGCGTATG	OPB-07	GGTGACGCAG
CC1	TGCCGAGCTG	OPG-02	GGCACTGAGG
CC2	AGTCAGCCAC	OPG-05	CTGAGACGGA
CC3	GGAGGGTGGT	OPG-07	GAACCTGCGG
CC4	AGGGAACGAG	OPG-08	TCACGTCCAG
CC5	TGAGTGGGTG	OPG-09	CTCTCCGCCA
CC6	AGATGCAGCC	OPX-04	CCGCTACCGA
CC7	ACGGATCCTG	OPX-07	GAGCGAGGCT

del ADN plantilla. En todos los casos se incluyeron controles, en los que el ADN se reemplazó por agua garantizando así que la amplificación no era producto de contaminaciones con ADN exógeno. Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, a 60 V durante 2h, coloreándolos con bromuro de etidio y observándolos a través de iluminación con luz UV.

Análisis de conglomerados. La comparación entre los perfiles de amplificación generados por cada iniciador se realizó con base en la asignación de 1 (en presencia) ó 0 (en ausencia), de productos de amplificación del mismo peso molecular. Así, bandas del mismo peso molecular se consideraron como idénticas. El análisis se realizó mediante el coeficiente de Jackard para el cálculo del índice de similaridad. Los dendrogramas se obtuvieron utilizando el método de agrupación UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average), en un programa elaborado en SAS por la disciplina de Biometría de Cenicafé y adicionalmente, se realizó el análisis de coordenadas principales en el programa NTSYS versión 2.01i (Exewter Software, New York, USA)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento micelial. El promedio de crecimiento diario de las colonias de *C. coffeicola* se observa en la Tabla 3. Para el análisis estadístico de este ensayo se realizó una regresión lineal y así mismo, se calculó el intervalo de confianza con el fin de buscar si los aislamientos se encontraban en los mismos intervalos y de esa forma relacionarlos entre sí. De acuerdo con los resultados, la tasa de crecimiento de los diferentes aislamientos mostró variaciones significativas entre ellos, donde el aislamiento A2 (Naranjal, Caldas) presentó una mayor velocidad de crecimiento con respecto a los aislamientos A7 (Supía, Caldas), A8, A9 (Cesar), A10 (Cundinamarca) y A11 (Norte de Santander), con los cuales no se traslapó su intervalo de confianza (Tabla 4). El aislamiento A2, presentó además poca homogeneidad en el crecimiento entre las réplicas, debido posiblemente a una inestabilidad genética del micelio durante los repiques, como se observa en el intervalo de confianza (Figura1).

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba se encontró variabilidad entre los diferentes aislamientos de *C. coffeicola* con respec-

TABLA 3. Promedio de tasas y análisis lineal del crecimiento micelial diario de aislamientos de *C. coffeicola* de diferente procedencia, de acuerdo a la regresión $ax+b$, donde a corresponde al crecimiento diario medido en mm, y b al corte con el eje y.

Aislamiento	Crecimiento diario (mm)	b	r ²
A1	0,6359	0,096	0,5331
A2	1,0842	0,114	0,7017
A3	0,8177	0,045	0,9204
A4	0,6749	0,089	0,6709
A5	0,9507	0,072	0,8602
A6	0,9566	0,078	0,7970
A7	0,5261	0,058	0,6779
A8	0,5209	0,012	0,9779
A9	0,5966	0,024	0,9402
A10	0,4611	0,034	0,8647
A11	0,4212	0,042	0,7119

to al crecimiento micelial, como se ha presentado con otros agentes patógenos que afectan el café y debido, posiblemente, a un constituyente poligénico relacionado con esta variable. Esta misma variabilidad fue encontrada por Nelson y Campbell (9) entre aislamientos de *Cercospora zebrina*, agente causante del «tallo negro de verano», en hojas, tallo y semilla del trébol blanco (*Trifolium repens* L.) provenientes de 4 condados de Carolina del Norte.

Patogenicidad. De acuerdo con el análisis estadístico realizado en la décima evaluación de síntomas presentes en las hojas de almácigo, se observaron diferencias en el grado de patogenicidad de los diferentes aislamientos de

C. coffeicola, lo cual permitió relacionarlos en dos grupos (Tabla 4). Los aislamientos pertenecientes al grupo A (A1, A3, A5, A7), procedentes de la región cafetera de Caldas y Quindío, presentaron mayor patogenicidad con respecto a los demás aislamientos, aunque no fueron estadísticamente diferentes a los aislamientos A2, A4 y A8, provenientes de las regiones de Caldas, Quindío y Cesar, que pertenecían al mismo grupo. La más baja patogenicidad se observó en los aislamientos A6, A9, A10 y A11, procedentes de Caldas, Cesar, Cundinamarca y

TABLA 4. Agrupamiento de los diferentes aislamientos de *Cercospora coffeicola*, mediante la prueba LSD de acuerdo con su patogenicidad en plántulas de almácigo de la variedad Caturra.

Aislamiento	Promedio de lesiones / hoja	N	Agrupamiento
A1		6	5
A			
A5	6	5	A*
A3	6	5	A
A7	6	5	A
A2	5,2	5	B A
A8	5,2	5	B A
A4	5,0	5	B A
A6	5,0	5	B
A9	4,2	5	B
A10	4,2	5	B
A11	4,2	5	B

*De acuerdo a la prueba LSD los aislamientos que comparten una misma letra no difieren y pertenecen a un mismo grupo

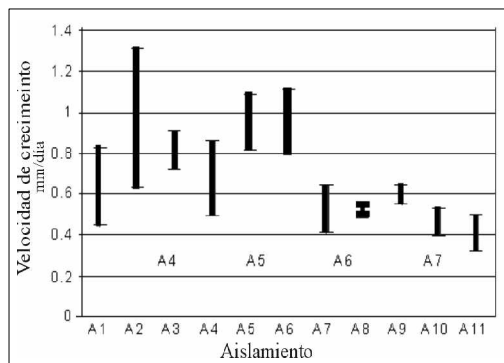


Figura 1. Intervalos de confianza de la velocidad de crecimiento micelial diario (mm) entre diferentes aislamientos de *Cercospora coffeicola*.

Norte de Santander, pertenecientes al grupo B y estadísticamente iguales a los aislamientos A1, A3, A5 y A7, provenientes de las regiones de Caldas y Quindío.

De acuerdo con estos resultados no fue posible establecer una relación directa entre las variables tasa de crecimiento micelial y patogenicidad, aunque algunos aislamientos con una baja tasa de crecimiento presentaron a su vez baja patogenicidad en almácigos. Tampoco fue posible asociar directamente la patogenicidad de los aislamientos con su origen geográfico.

Esta misma variabilidad en la patogenicidad había sido observada por Giraldo (4), quien encontró variabilidad en la patogenicidad de aislamientos de *C. coffeicola* provenientes de frutos y hojas de café a partir de muestreos pequeños realizados en pocos sitios de la zona cafetera, y por Brun et al (2), quienes también encontraron diferencias en patogenicidad entre varios aislamientos de *Cercospora* ssp provenientes de 13 poblaciones naturales de *Heliotropium* ssp en Francia, Turquía y Australia.

La prueba de Bonferroni utilizada para el análisis de las pruebas de patogenicidad en hojas y frutos desprendidos no mostró diferencias significativas entre los aislamientos ya que todos

ellos pertenecían a un mismo grupo (Tabla 5), lo cual impidió su discriminación y no permitió establecer relaciones entre estas variables con la patogenicidad en plántulas, el origen geográfico o la tasa de crecimiento micelial de los mismos. Brun et al (2), en estudios con *Cercospora* ssp, tampoco encontraron una relación entre los resultados obtenidos con las pruebas de patogenicidad en hojas desprendidas y en plántulas. Esto puede deberse, posiblemente, a las diferencias de temperatura y de humedad relativa prevalentes en ambos métodos.

Sería necesario poder complementar las pruebas de patogenicidad determinando no solamente el número de lesiones sino también, calculando el índice de infección y el porcentaje de distribución en las hojas. Así mismo, se recomienda realizar las pruebas de patogenicidad en materiales de café, ya sean plántulas u hojas desprendidas que sean de una misma variedad y edad, con el fin de obtener resultados más confiables y que puedan compararse.

Análisis de RAPDs. La técnica de RAPDs, estandarizada para *C. coffeicola* durante este estudio demostró ser una valiosa herramienta en la diferenciación y determinación de la variabilidad entre los aislamientos del hongo. De los 30 iniciadores utilizados todos, con excepción de M15, revelaron polimorfismo entre los 11 aisla-

TABLA 5. Agrupamiento de los diferentes aislamientos de *C. coffeicola* mediante el test de Bonferroni, de acuerdo con su patogenicidad en hojas y frutos desprendidos de la variedad Caturra.

Aislamiento	N	Promedio de lesiones/hoja	Agrupamiento	Promedio lesiones /fruto	Agrupamiento
A7	5	3,6	A	1,6	A
A5	5	3,4	A	1,6	A
A10	5	2,8	A	1,6	A
A3	5	2,4	A	1,4	A
A9	5	2,4	A	1,4	A
A2	5	2,2	A	1,4	A
A8	5	2,2	A	1,2	A
A1	5	2,2	A	1,2	A
A4	5	1,6	A	1,2	A
A6	5	1,4	A	1,2	A

mientos de *C. coffeicola*, lo cual demostró la amplia diversidad genética que se encuentra en este patógeno.

Dependiendo del iniciador utilizado se generaron entre 8 y 20 productos de amplificación de los cuales no todos fueron polimórficos y presentaron un tamaño que osciló entre 250 y 4500 pares de bases. De un total de 406 bandas obtenidas con todos los primers, 265 resultaron polimórficas, presentándose un 65,3% de polimorfismo entre los aislamientos. El mayor número de fragmentos se obtuvo con el iniciador CC7 (25 bandas en 11 aislamientos) (Figura 2).

En el análisis de conglomerados, las bandas idénticas fueron removidas ya que de acuerdo con Bridge(3) la estructura del dendrograma resultante no se altera, y solamente se tuvieron en cuenta 234 fragmentos polimórficos generados por todos los iniciadores, descartando las bandas amplificadas con los primers OPG-09, OPG-07 y OPX4 (Tabla 6), en los cuales no hubo amplificación de todos los aislamientos. Para la creación del dendrograma se utilizó el

índice de Jackard y el método de agrupamiento UPGMA. Se sugiere la presencia de 2 grupos, uno formado solamente por el aislamiento A1, que se encontraba a una distancia genética de 0,43 respecto del otro grupo, donde se encontraban distribuidos los demás aislamientos. Este segundo, a su vez, estaba dividido en dos: el primero formado por los aislamientos A2, A10, A6, A7, A8, A9 y A11, y el segundo grupo conformado por A3, A5 y A4. En el dendrograma no pudieron relacionarse directamente las ramas con la procedencia geográfica, la tasa de crecimiento micelial o la patogenicidad de los aislamientos (Figura 3).

El análisis de los datos con el método de coordenadas principales sugiere la presencia de 2 grupos, aunque marca más claramente la división de los subgrupos de la rama del dendrograma (Figura 4), confirmando la presencia de grupos naturales observada en el mismo.

El polimorfismo que presentaron los aislamientos pudo deberse a los mecanismos usuales de mutación, recombinación, segregación, pro-

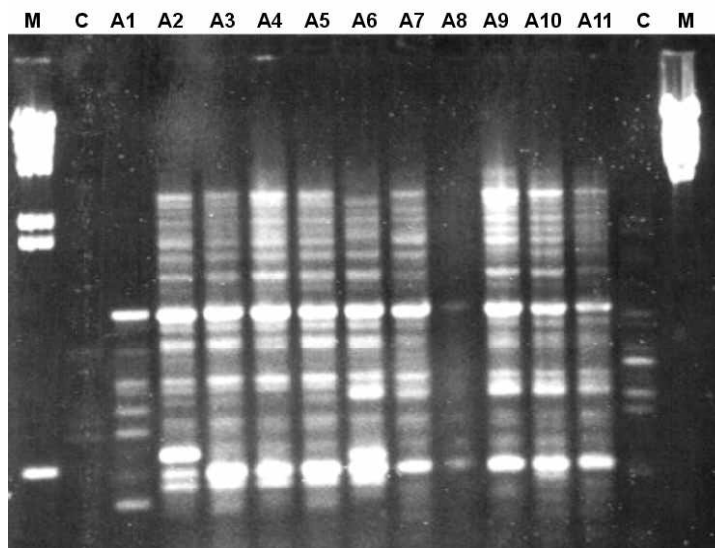


Figura 2. Perfil de amplificación generado por el iniciador CC7.

TABLA 6. Matriz de índices de similitud generado con todos los iniciadores, descartando las bandas amplificadas con los primers OPG-09, OPG-07 y OPX4.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
A1	1,0000										
A2	0,4333	1,0000									
A3	0,4392	0,5195	1,0000								
A4	0,4051	0,5093	0,5157	1,0000							
A5	0,4024	0,5305	0,6275	0,5176	1,0000						
A6	0,3481	0,5230	0,4775	0,4945	0,5909	1,0000					
A7	0,4688	0,5610	0,4767	0,5029	0,5575	0,5922	1,0000				
A8	0,4865	0,4969	0,4142	0,4335	0,4302	0,5000	0,5629	1,0000			
A9	0,4522	0,5183	0,5153	0,4971	0,5529	0,6069	0,6402	0,6076	1,0000		
A10	0,4091	0,5355	0,4132	0,4583	0,4457	0,4916	0,5732	0,4379	0,5688	1,0000	
A11	0,5257	0,5159	0,4479	0,4939	0,4624	0,5257	0,5926	0,5779	0,5987	0,5686	1,0000

pagación clonal y adaptación a hospedantes específicos, de acuerdo con Bridge (3). Entre los mecanismos especializados que llegan a producir variabilidad en patógenos se encuentra la heterocariosis, en la cual, células de la hifa del hongo o partes de la hifa contienen dos o más núcleos que son genéticamente diferentes (1).

Aparte de un estudio de identificación de marcadores RAPD ligados al gen de resistencia a *Cercospora sojina* raza 7 en soya (5), y hasta donde se conoce, este es el primer estudio que involucra variación molecular en este género, y

se espera que con el desarrollo de marcadores más poderosos (SCARs o Microsatélites) se pueda profundizar en el conocimiento de las poblaciones de este importante patógeno del café.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Alvaro Gaitán B. por la revisión del manuscrito y a Carlos Hugo del Río, Ana Milena Valderrama y Hernando García por su colaboración en distintas etapas de esta investigación.

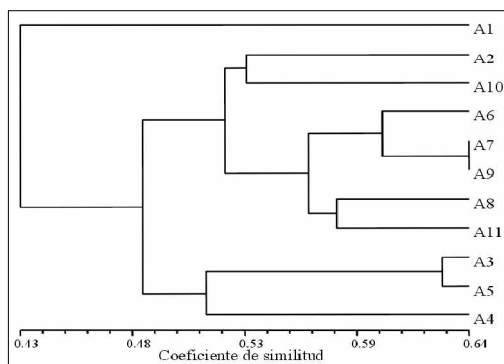


Figura 3. Dendrograma de las relaciones entre los once aislamientos de *C. coffeicola*, generado con todos los iniciadores, descartando las bandas amplificadas con los primers OPG-09, OPG-07 y OPX4

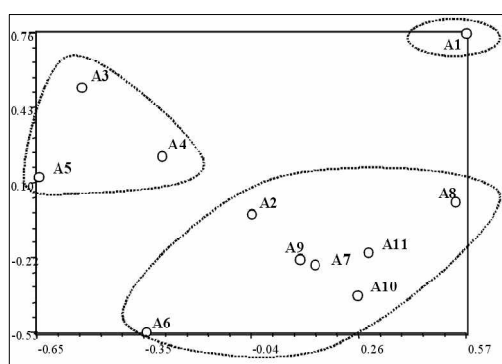


Figura 4. Análisis de coordenadas principales de los once aislamientos de *C. coffeicola*, generado con todos los iniciadores y descartando las bandas amplificadas con los primers OPG-09, OPG-07 y OPX4.

LITERATURA CITADA

1. AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 4. ed. San Diego, Academic Press, 1997. p.118-119.
2. BRUN, L.; SHEPPARD, A.W.; LOPES, V. Variation in pathogenicity of isolates of *Cercospora* spp. Attacking *Heliotropium* spp. Annals of Applied Biology 128(3):565-570. 1996.
3. BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. Molecular variability of fungal pathogens. Wallingford, CAB International, 1998. p. 291-295.
4. GIRALDO, C.L. Informes de labores realizadas durante el período de prácticas del 4 de febrero al 5 de junio de 1992. Chinchiná Fundación Universidad Católica. Facultad de Bacteriología. s,n,t.
5. JIJUN, Z.; WEI, D.; QINGKAI, Y.; YUEPING, C.; SHOUYI, CH.. Identification of RAPD markers linked to *Cercospora sojina* race 7 resistance gene in soybean. Soybean Genetics Letter 25:39-40. 1998.
6. LEGUIZAMÓN C., J.E. Variabilidad de aislamientos de *Cercospora coffeicola* Berk.y Cook. agente causal de la Mancha de hierro en el café. In: Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología, 13. Villavicencio, Agosto 12-14, 1992. Resúmenes. Bogotá, ASCOLFI, 1992. p. 64.
7. LÓPEZ D, S.I.; FERNANDEZ B, O. Epidemiología de la Mancha de hierro del cafeto. Revista Cafetera de Colombia 19(147): 51-67. 1970
8. Mc DONALD, B.A. The population genetics of fungi: Tools and techniques. Phytopathology 87(4): 448-453.1997.
9. NELSON, S.C.; CAMPBELL, C.L. Host range and cultural characteristic of *Cercospora zebrina* from white clover in North Carolina. Plant Disease 74(11): 874-878. 1990
10. WILLIAMS, G.K.; RUBELIK, R.A.; RAFALSKI A., J. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18(22): 6531-6535. 1990.
11. ZOLAN, M.E.; PUKKILA, P.J. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. Molecular and Cellular Biology 6:195-200. 1986.