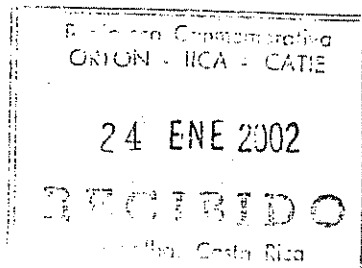


CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSGRADUADOS



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE AISLAMIENTOS
DEL HONGO *Mycena citricolor* COLECTADOS EN DIFERENTES ZONAS
CAFETALERAS DE COSTA RICA.**

POR

ALEX LÓPEZ ARGUEDAS

CATIE

Turrialba, Costa Rica
2001

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA

ÁREA DE POSTGRADO



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE AISLAMIENTOS
DEL HONGO *Mycena citricolor* COLECTADOS EN DIFERENTES ZONAS
CAFETALERAS DE COSTA RICA.**

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

por

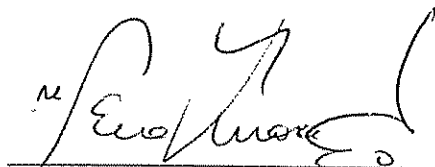
✓
ALEX LÓPEZ ARGUEDAS

CATIE
Turrialba, Costa Rica
2001

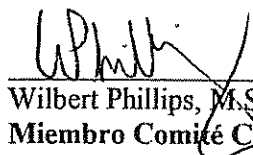
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



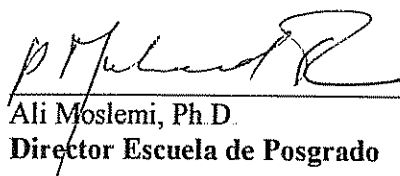
Vera Sánchez, Ph D.
Consejero Principal



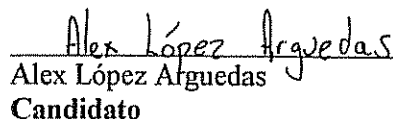
Wilbert Phillips, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Carlos Astorga, M Sc.
Miembro Comité Consejero



Ali Moslemi, Ph.D.
Director Escuela de Posgrado



Alex López Arguedas
Candidato

DEDICATORIA

A todas las personas humildes y de buen corazón que aportaron un poquito para hacer realidad este documento.

A mi madre y mis hermanas

Ninoska Valentina

Nuria María

que sin importar las distancias siempre han estado conmigo.

A mi esposa Heylen y a mis hijas

Paula Alexandra

Jimena

Por su amor y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Debido a mi memoria tan mala posiblemente no le agradezco a personas que colaboraron en este trabajo, espero sepan disculparme.

A mi consejera, Vera Sánchez Ph.D. por sus valiosos consejos y colaboración en la realización de este documento.

A Wilbert Phillips Mora M. Sc. Por sus sugerencias y consejos en la elaboración de este documento.

A Carlos Astorga Domian M. Sc. Por sus sugerencias y consejos en el desarrollo de este trabajo.

A Willy y Olman por haber colaborado en este trabajo de una forma tan desinteresada.

A Manrique González por su valiosa colaboración durante la etapa de campo y laboratorio.

Fredy Rosales por la valiosa ayuda en la elaboración de los mapas utilizados en esta investigación.

A Gustavo López por el apoyo en el análisis estadístico de los resultados.

Al personal de la Biblioteca Conmemorativa ORTON.

Finalmente agradezco a la empresa Standard Fruit Company de Costa Rica y DANIDA por el financiamiento en mis estudios.

CONTENIDO

	Pag
CONTENIDO	v
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVO GENERAL	3
1.1.1. Objetivos específicos	3
1.2. Hipótesis	3
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Descripción del patógeno	4
2.1.2. Clasificación taxonómica de <i>M. citricolor</i>	5
2.1.3. Ciclo de vida de los hongos basidiomycetes	6
2.1.4. Descripción Morfológica	7
2.1.5. Reproducción	7
2.1.6. Efecto fisiológico en las gemas infectivas	8
2.1.7. Síntomas y daños	9
2.1.8. Epidemiología	10
2.2. Procesos que producen variabilidad en los hongos fitopatógenos	11
2.2.1. Mutación	11

2.2.2.	Selección natural	11
2.2.3.	Recombinación	12
2.2.4	Flujo de genes	12
2.2.5	Deriva genética	13
2.3.	Caracteres morfológicos	13
2.4.	Marcadores Moleculares	14
2.4.1.	RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar)	14
2.4.2.	Proceso de análisis RAPD	16
2.5.	Sistemas de información geográfica: Herramienta para la referencias espaciales de la diversidad genética	18
3.	METODOLOGÍA	20
3.1.	Recolección de muestras en el campo	20
3.1.1.	Caracterización del sitio	21
3.1.2.	Datos metereológicos	21
3.2.	Investigación de laboratorio	21
3.2.1.	Aislamiento y multiplicación del hongo en el laboratorio	22
3.3	Estudio morfológico	22
3.3.1.	Diseño experimental	22
3.3.2.	Variables evaluadas	23
3.4	Estudio molecular	24
3.4.1.	Crecimiento del hongo en medio mineral y preparación de muestras para la extracción de ADN.	24
3.4.2.	Extracción de ADN	25
3.4.3.	Determinación de la calidad y cuantificación de ADN	26

3.4.4. Selección de “primers” y amplificación	27
3.5. Análisis de datos moleculares	28
3.5.1. Registro de datos y generación de matriz binaria	28
3.5.2. Coeficientes de similitud y distancias genéticas	28
3.5.3. Dendograma	29
3.5.4. Prueba de X^2	29
3.6 Tabulación, organización de datos metereológicos y análisis a partir de los Sistemas de Información Geográfica (SIG)	29
3.6.1. Bases de datos	29
3.6.2. Manejo de la información del programa ARCVIEW	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Aislamientos colectados	32
4.2. Caracterización morfológica	33
4.2.1. Diámetro de la colonia, longitud del pedicelo y diámetro de la gema.	33
4.2.2. Coloración del micelio	38
4.2.3. Color de gemas	38
4.2.4. Patrón de crecimiento del micelio	41
4.3. Estudio molecular	44
4.3.1. Medio de cultivo mineral	44
4.3.2. Aislamiento y determinación de la concentración de ADN	45
4.3.3. Amplificación del ADN	46
4.3.4. Análisis de polimorfismos revelados	47
4.3.5. Caracterización molecular de los aislamientos	48
4.3.6. Matriz de distancia y dendograma	49

4.3.7. Prueba de X^2	52
4.4. Comparación de la variabilidad detectada a partir de caracteres morfológicos y marcadores moleculares	53
4.4.1. Variables cuantitativas	53
4.4.2. Color de las gemas	54
4.4.3. Patrón de crecimiento del micelio <i>in vitro</i>	54
4.5. Comparación entre variables climáticas por medio de los Sistemas de Información Geográfica y la diversidad genética detectada por los marcadores moleculares	55
4.5.1. Brillo solar	55
4.5.2. Evapotranspiración	56
4.5.3. Precipitación pluvial	56
4.5.4. Temperatura	56
5. CONCLUSIONES	58
6. RECOMENDACIONES	60
7. LITERATURA CONSULTADA	61
8. ANEXOS	69

López, AA. 2001. Caracterización molecular y morfológica de aislamientos del hongo *Mycena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica. Tesis Mag. Sci. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 103 p.

Palabras claves: *Mycena citricolor*, caracterización, diversidad genética, RAPD.

RESUMEN

El cultivo del café representa una de las mayores fuentes de divisas para la región Centroamericana. Durante el periodo 1997-1998 la producción de café en Centro América alcanzó los 11.9 millones de sacos; ocupando la tercera posición en cuanto a producción en el mundo. La producción de este cultivo se concentra en manos de pequeños agricultores y es una fuente importante de generación de empleo (IICA, 1998 y 1999).

Mycena citricolor conocida comunmente como ojo de gallo, es una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo del café en Costa Rica. Se estima que de las 110,000 hectáreas de café sembradas, entre 10 y 15% están afectadas por ojo de gallo. Un cálculo conservador elaborado por el Departamento de Protección de cultivos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), estimó que anualmente esta enfermedad deja pérdidas por 10 millones de dólares a la caficultura nacional (Vargas, 2000). Existe poca investigación disponible sobre la biología del patógeno. Por lo tanto, sería muy útil conocer la variabilidad genética del patógeno para establecer un mejor control del mismo. Esta investigación tuvo como objetivos principales: agrupar mediante análisis molecular y morfológico la diversidad genética del hongo *Mycena citricolor* en zonas cafetaleras de Costa Rica. y determinar el nivel de variabilidad genética mediante el estudio molecular y morfofisiológico de 26 aislamientos.

En la caracterización molecular se utilizó medio mineral para producir micelio de calidad y se aplicó el procedimiento MATAB en la extracción de ADN. Además, se utilizó marcadores RAPD y por medio de una matriz de distancias genética, se determinó el nivel de variabilidad de 26 aislamientos de *M. citricolor*. Además, se elaboró un dendograma que agrupó los aislamientos en cuatro grupos de acuerdo a su distancia genética, con una tendencia de agrupación de acuerdo a su origen geográfico. Se identificó 81 bandas polimórficas a partir de 17 "primers", de los cuales 14 bandas aportaron el mayor valor significativo para diferenciar entre los grupos.

La caracterización morfológica estuvo constituida por variables cuantitativas y cualitativas, siendo el diámetro de la colonia, presencia-ausencia de gema y pedicelo, color de las gemas y el patrón de crecimiento in vitro las que permitieron establecer diferencias entre los aislamientos. Se utilizó la tabla de colores Munsell para diferenciar el color de las gemas en los 26 aislamientos, identificándose 5 valores cromáticos: 2.5 Y(8/6), 2.5 Y(8/12), 5Y(8/8), 5Y(8/10), 5Y(8/12). También, se identificó 6 diferentes patrones de crecimiento. Finalmente se comparó los grupos genéticos obtenidos con datos meteorológicas de Costa Rica, siendo la variable brillo solar la que mayor relación presentó con el análisis molecular. Cada una de las herramientas en el presente estudio permitió caracterizar a 26 aislamientos de *Mycena citricolor* y de esta forma conocer más acerca del comportamiento de este patógeno.

López, AA. 2001. Molecular and morphologic characterization of isolations of *M. citricolor* fungus in coffee zones of Costa Rica. Thesis Mag. Sci. Catie. Turrialba, Costa Rica. 103 p.

Keywords: *Mycena citricolor*, characterization, genetic diversity, RAPD.

SUMMARY

Coffee crop represents one of the most important financial sources for the Central American region. During the 1997-1998 period, coffee production in Central America reached 11,9 million sacs; occupying the third position as far as production in the world. The production of this culture is concentrated in the hands of small producers and it is an important source of employment. (IICA, 1998 and 1999).

Well-known *Mycena citricolor* commonly as “ojo de gallo”, is one of the diseases of great importance in coffee production in Costa Rica. It has been estimated that out of 110.000 planted 10 and 15% is affected by ojo de gallo. A conservative calculation processed by the Department of Protection of cultures of the Ministerio de agricultura y Ganadería (MAG), considered that this disease represents 10 million dollar annual loss to the national coffee production (Vargas, 2000). Little investigation is focused on knowing the behaviour of the pathogen. Therefore, it is necessary to know the genetic variability of the pathogen to establish a better control its effect.

The main objectives were: to group by means of molecular and morphologic analysis, the genetic diversity of *Mycena citricolor* fungus in coffee zones of Costa Rica. Also to determine the level of genetic variability by means of the molecular and morphologic study of 26 isolations. The molecular characterization used mineral medium to produce micelio high quality and procedure MATAB in the DNA extraction was applied. In addition, RAPD markers were used and the level of variability of 26 isolations of *M. citricolor* was determined by means of a genetic matrix of distances, in addition, dendrogram that grouped the isolations in four groups according to its genetic distance, with a tendency of grouping according to its geographic origin was processed. 81 polymorphic bands were identified out of 17 primers and of which 14 bands gave the greater significant contribution to differentiate between the groups. The morphologic characterization was constituted by quantitative and qualitative variables, being the variables diameter of the colony, absence-present of gems and “pedicelo”, gems color and pattern of growth those that allowed to establish differences between the isolations. The table of Munsell colors was used to differentiate the color in gems from the 26 isolations, identifying 5 chromatic values: 2,5 Y(8/6), 2,5 Y(8/12), 5Y(8/8), 5Y(8/10), 5Y(8/12). Also 6 different Growth pattern were identified. Finally the genetic groups obtained with meteorology data of Costa Rica were compared, being the variable solar brightness the one with greater relation presented/displayed in the molecular analysis. Each one of the tools in the study allowed to characterize to 26 isolations of *Mycena citricolor* in order to know more about the behavior of the genetic diversity this pathogen.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación regional de los 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> utilizadas en el estudio de variabilidad genética. CATIE, 2001.....	32
Cuadro 2. Distribución del color de las gemas en 16 aislamientos de <i>M. citricolor</i> , de acuerdo la tabla de colores de Munsell (1977). CATIE, 2001.....	38
Cuadro 3. Patrón de crecimiento de 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> . CATIE, 2001.....	41
Cuadro 4. Producción de micelio seco de 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> . CATIE, 2001.....	45
Cuadro 5. Rendimiento de la extracción de ADN mediante el método MATAB.A partir de los 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> estudiados. CATIE, 2001.....	46
Cuadro 6. Secuencia, número y tamaño de bandas para cada uno de los “primers”polimórficos utilizados. CATIE, 2001.....	48

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. ciclo de vida general de hongos Basidiomycetes.....	6
Figura 2. Representación de la estructura asexual “gema” en medio de cultivo (A), y la estructura sexual “basidiocarpio” (B) en el hongo <i>M. citricolor</i>	8
Figura 3. Ubicación geográfica de cada una de las muestras tomadas en Costa Rica .CATIE, 2001.....	20
Figura 4. Diámetro de la colonia promedio a los ocho días después de la inoculación crecimiento, tres grupos formados a partir de 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> . CATIE, 2001.....	34
Figura 5. Fenograma de 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> a partir de variables cuantitativas crecimiento radial de la colonia, ausencia - presencia de gema y pedicelo por medio del método Ward, atravez del programa SAS. CATIE, 2001.....	37
Figura 7. La fotografía muestra un cultivo del aislamiento de CATIE (Cat-13) cuyo color de las gemas corresponde al valor cromático 5Y(8/10), según la tabla de colores Munsell. CATIE, 2001.....	40
Figura 8 La fotografía muestra un cultivo del aislamiento de San Miguel (SMig-4) cuyo color de las gemas corresponden al valor cromático 5Y (8/8) , según la tabla de colores de Munsell.CATIE, 2001.....	40

Figura.9. Fotografías que presentan los 6 patrones de crecimiento observados en los 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> . 1) Chitaría 17 (Chit-17) con micelio anillado, con ramificaciones en forma de estrella 2) Honduras (Hon-26) con micelio anillado ramificado y algodonoso. 3) Venecia (Ven-3) con micelio anillado con ramificaciones que se extienden desde el centro hasta el borde del plato. 4) Sarchí (Sar-5) con micelio anillado y granulado. 5) San Marcos (SMarc -2) con micelio anillado, granulado y ramificado. 6) Pavones (Pav-14) con micelio anillado con ramificaciones no continuas y crecimiento circular de gemas en el centro del micelio.....	43
Figura. 10. Glóbulos de micelio producido en el medio mineral a partir de gemas de <i>M. citricolor</i> , a los 7 días de incubación (23°C). CATIE, 2001.....	44
Figura 11 Fotografía que muestra la amplificación de ADN en 9 aislamientos de <i>M. citricolor</i> utilizando la técnica RAPD y el “primer” OPC18. De izquierda a derecha las muestras fueron: Plat-20, Plat-21, Pej-22, Caj-23, SPed-24, PVit-25, Hon-26, ALeg-1, Ven-3. Se colocó a la derecha el marcador de 100 pb para referencia de los fragmentos revelados. CATIE, 2001.....	48
Figura 12 Dendograma generado a partir de 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> . Basado en el índice de Jaccard. CATIE, 2001.....	50

ANEXOS

	Pag
Anexo 1. Registro de la información geográfica y topográfica de los sitios de colecta de <i>M. citricolor</i> . CATIE, 2001.....	70
Anexo 2. Medio mineral utilizado en la producción de micelio de aislamientos del hongo <i>M. citricolor</i> . Weising <i>et al.</i> 1995.....	72
Anexo 3. Protocolo MATAB (Mixed Alkyltri-Methylammonium Bromide). Modificado en el laboratorio de biología molecular del CATIE, 2001.....	73
Anexo 4. Metodología para la cuantificación de ADN con electroforesis en gel de agarosa. Modificada en el laboratorio de Biología Molecular. CATIE, 2001.....	74
Anexo 5. Composición del buffer TBE 0,5X (Tris Borato EDTA). CATIE, 2001.....	76
Anexo 6. Protocolo para el análisis RAPD. CATIE, 2001.....	77
Anexo 7. Preparación de mezcla maestra. CATIE, 2001.....	78
Anexo 8. Diámetro de la colonia a los 8 días después de la inoculación, longitud de pedicelo y diámetro de la gema promedio a los 20 días después de la inoculación en 26 aislamientos de <i>M.citricolor</i>	79
Anexo 9. Análisis de varianza y prueba Duncan para los promedios de la variable morfológica diámetro de la colonia (mm), longitud de pedicelo (mm) y diámetro de la colonia (mm) de 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i>	80
Anexo 10. Análisis de varianza y prueba Duncan para la variable cuantitativa longitud del pedicelo (mm) en 16 aislamientos de <i>M. citricolor</i>	81
Anexo 11. Análisis de varianza y prueba Duncan para la variable cuantitativa de Diámetro de gema (mm) en 16 aislamientos de <i>M. citricolor</i>	82

Anexo 12. Análisis estadístico para la variable rendimiento de micelio seco en 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i>	83
Anexo 13. Distancias genéticas calculadas a partir del índice de jaccard, con el programa computacional SAS para 26 aislamientos de <i>M. citricolor</i> . CATIE, 2001.....	84
Anexo 14. Mapa 1. Referencia geográfica de la procedencia de las muestras de <i>M. citricolor</i> . Mapa 2. Brillo solar de Costa Rica. Mapa 3. Evapotranspiración de Costa Rica. Mapa 4. Precipitación de Costa Rica. Mapa 5. temperatura de Costa Rica. Mapa 6. Áreas propicias para el desarrollo de <i>M. citricolor</i> . Ubicación de los grupos genéticos de <i>Mycena citricolor</i>	86

1. INTRODUCCION

El cultivo del café representa una de las mayores fuentes de divisas para la región Centroamericana. Durante el periodo 1997-1998 la producción de café en Centro América alcanzó los 11.9 millones de sacos; ocupando la tercera posición en cuanto a producción en el mundo. La producción de este cultivo se concentra en manos de pequeños agricultores y es una fuente importante de generación de empleo, generando 236 mil empleos directos y 1.2 millones de empleos indirectos (IICA, 1998 y 1999).

El hongo *Mycena citricolor* conocido comúnmente como ojo de gallo, es una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo del café en Costa Rica. Se estima que de las 110,000 hectáreas de café sembradas en Costa Rica entre 10 y 15% están afectadas por ojo de gallo. Un cálculo conservador elaborado por el Departamento de Protección de cultivos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), estimó que anualmente esta enfermedad produce pérdidas por 10 millones de dólares a la caficultura nacional (Vargas, 2000).

La aplicación de fungicidas para el control de *M. citricolor*, ha sido utilizada durante mucho tiempo. El caldo bordelés fue el primer fungicida usado y todavía es de uso frecuente, sin embargo, su poca persistencia sobre el tejido, durante las épocas de mayor precipitación, resultaba en un control deficiente de la enfermedad (Wang y Avelino 1999). Además, se han obtenido buenos resultados con la aplicación de carbonato de calcio, que actúa como neutralizador del ácido oxálico que produce el hongo (Vargas *et al.* 1991). Sin embargo, estos y otros productos químicos continúan en investigación y hasta la fecha no está disponible un producto químico altamente eficiente.

El elevado costo de los productos químicos y la contaminación que estos producen al ambiente, han aumentado el interés por otros métodos de control. Entre ellos, el control biológico representa una alternativa interesante. Vargas (1995), menciona que durante 10 años se han hecho estudios para buscar alternativas de combate del ojo de gallo, por ejemplo, se ha investigado a nivel de campo el hongo *Trichoderma* spp como agente de control biológico de este patógeno. No obstante, se ha sugerido la presencia de ecotipos del hongo *Trichoderma* spp que logran establecerse solo en ciertos agroecosistemas, como el principal limitante para poder lograr un control eficiente (Páez 1976, Vargas 1984, Arroyo 1975 y Curling 1986).

Gran parte de estas investigaciones han llegado a reconocer que es necesario un mayor conocimiento de la diversidad genética de *M. citricolor* para facilitar la selección de estrategias de control más eficientes. Sin embargo, a la fecha, son pocos los estudios en *M. citricolor* que aportan información sobre este aspecto. Wang y Tewari (1990), estudiaron la morfología de 26 aislamientos del hongo procedentes de hojas infectadas con *M. citricolor* de diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica, y de 7 cultivos monospóricos obtenidos de basidiocarpos. Los análisis permitieron agrupar los aislamientos con características similares. Se formaron dos grupos, uno que incluyó todos los aislamientos procedentes de *Coffea liberica* y el resto de aislamientos procedentes de hojas enfermas de *C. arabica* y *C. canephora*.

Vargas (2000), observó dos aislamientos que eran morfológicamente diferentes. Uno de ellos provenía de cafetales de Turrialba expuestos a aplicaciones no controladas de triazoles, el cual presentaba un micelio blanco en conglomerados y lento crecimiento. El otro aislamiento proveniente de la zona montañosa de Carrizal de Alajuela, obtenido en una finca sin aplicaciones de fungicidas, que presentaba un micelio blanco, uniforme y rápido crecimiento. Estas diferencias podrían expresar algún grado de variabilidad genética en el hongo.

Durante los últimos años las técnicas moleculares han facilitado investigaciones en una variedad de disciplinas como lo son, la taxonomía, filogenia, ecología, genética y mejoramiento de plantas (Weising, *et al.* 1995). Con los marcadores moleculares es posible caracterizar el contenido de ADN, esta información puede ser utilizada en forma complementaria a la caracterización fenotípica, para organizar en forma más adecuada y eficiente una población. El uso de marcadores moleculares como RAPD o "Random Amplified Polymorphic DNA" (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) ha mostrado su efectividad para caracterizar la diversidad genética de hongos fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum* en pepino y *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol (Vakalounakis *et al.* 1999 y González, 1998).

De acuerdo con lo anterior, se considera que la caracterización molecular de aislamientos representativos de *M. citricolor*, en combinación con su caracterización morfológica y la información bioclimática procedente de los sitios de muestreo, podría aportar nueva y valiosa información para ayudar a conocer el nivel de diversidad que el hongo posee en Costa Rica y de esta forma mejorar la efectividad de las estrategias de control. Esto a su vez ayudaría también a orientar la selección de agentes de control biológico (hiperparásitos o sus mezclas).

1.1. OBJETIVO GENERAL

- a) Determinar el nivel de variabilidad genética de *M. citricolor* en algunas zonas cafetaleras de Costa Rica mediante el estudio molecular y morfofisiológico de aislamientos representativos.

1.1.1. Objetivos específicos:

- 1) Determinar la eficiencia del protocolo "MATAB" para la extracción de ADN de *M. citricolor*.
- 2) Determinar la eficiencia de los marcadores moleculares RAPD para caracterizar la variabilidad genética de *M. citricolor*.
- 3) Caracterizar morfológicamente aislamientos de *M. citricolor* utilizando parámetros cualitativos y cuantitativos que permitan reconocer los grupos genéticos, a nivel de cultivo *in vitro*.
- 4) Comparar los aislamientos de acuerdo a los análisis de ADN y análisis morfológico.
- 5) Relacionar la diversidad genética detectada con las condiciones climáticas de los sitios de recolección.

1.2. Hipótesis:

- 1) Es posible distinguir aislamientos de *M. citricolor* usando la técnica RAPD y mediante la caracterización morfofisiológico.
- 2) Hay relación entre los resultados moleculares y morfofisiológico.
- 3) El análisis morfológico y molecular permite agrupar los aislamientos del hongo *M. citricolor* en grupos definidos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Descripción del hongo *M. citricolor*

M. citricolor fue estudiado por primera vez en 1876 por N. Sáenz, profesor de ciencias naturales de la Universidad de Bogotá, Colombia. Durante muchos años recibió diferentes nombres debido a las nuevas características que le fueron descubiertas. *Stilbum flavida* fue el nombre asignado por el micólogo M.C. Cooke en 1880, dentro de los hongos imperfectos. En 1914 los doctores Maublanc y Rangel modificaron su posición sistemática y lo denominaron *Omphalia flavida*. Ellos encontraron por primera vez la estructura sexual del hongo; colectando cerca de Río de Janeiro, hojas enfermas de *Eriobotrya Japonica* (níspero), las cuales colocaron por varios días en una atmósfera saturada de humedad, donde observaron un pequeño basidiocarpo desarrollado en una de las lesiones. El mismo cuerpo fructífero fue observado de nuevo bajo condiciones similares sobre manchas de hojas de especies de *Melastomaceae* y *Compositae*. También sobre estas manchas se desarrollaron los cuerpos reproductivos de *Stilbum* y los consideraron como formas abortivas del estado perfecto de un Basidiomycete del género *Omphalia*. Clasificaron de esta forma, momentáneamente al hongo, con el nombre de *Omphalia flavida* Maubl & Rang (Carvajal, 1939). Finalmente Dennis en 1950, después de examinar muestras de *Agaricus citricolor* Bert. & Curt., llegó a la conclusión de que *A. citricolor* era una especie de *Mycena* y sugirió el nombre de *Mycena citricolor*, que es actualmente el binomio por el cuál se le conoce a este hongo (Wang y Avelino, 1999). En el caso de *M. citricolor* se ha reportado un amplio rango de hospederos, existen más de 550 especies de plantas que son susceptibles a ser atacados por este hongo (Wang y Avelino, 1999).

En Costa Rica se conoce esta enfermedad desde el año 1880, año en que produjo graves daños en café. Durante la historia del cultivo del café, esta enfermedad ha sido una de las más importantes en Costa Rica debido a los daños que ha ocasionado. Por esta razón se le ha prestado mucha atención y estudio para conocer mejor su naturaleza y buscar los medios para combatirla (Carvajal, 1939).

2.1.2. Clasificación taxonómica de *M. citricolor*

El hongo *Mycena citricolor* se clasifica dentro de la familia Agaricaceae :

Clase: Basidiomycete.

Sub clase: Homobasidiomycete.

Orden Agaricales (Wang y Avelino 1999).

La clase Basidiomycetes agrupa una gran variedad de hongos y comprende alrededor de 13,000 especies entre los que figuran las setas, los hongos anaquel, los cuernos apestosos, las royas, los carbones, mycenas y muchos más (Alexopoulos, 1962). Además, incluye especies útiles y perjudiciales para el hombre. La industria de los champiñones (*Agaricus Campestris*) es un ejemplo de la utilidad, como alimento de algunas especies (Romero, 1988).

Los Basidiomycetes producen sus basidios en cuerpos fructíferos altamente especializados, llamados basidiocarpos (Gr. Basidion = base pequeña, basidio y carpós = frutos). Los basidiocarpos pueden ser delgados o gruesos y de consistencia gelatinosa, cartilaginosa, carnosa, esponjosa, corchosa, leñosa. Su tamaño también es muy variable, algunos son microscópicos, mientras otros alcanzan un metro o más de diámetro (Romero, 1988).

Casi todos los Basidiomycetes producen sus basidios en basidiocarpos, excepto los carbones, las royas y los Exobasidiales. Muchos de estos cuerpos fructíferos son suficientemente conocidos, como, las setas, los hongos coral y las estrellas terrestres. Los basidios se forman en capas definidas llamadas himenios. Consecuentemente, en un basidiocarpo, los basidios se encuentran mezclados con estructuras estériles, parafisos y cistidios (Alexopoulos, 1962; Romero, 1988).

Los basidiomycetes superiores poseen un basidio de forma simple o claviforme. El basidio se desarrolla a partir de la célula terminal de una hifa binucleada y se separa por medio de un septo; al principio es angosto y alargado; sin embargo, al crecer se ensancha tomando la forma de clava. Simultáneamente ocurre la cariogamia y luego la meiosis, lo que da como resultado la formación de cuatro núcleos haploides. Posteriormente se forman cuatro esterigmas en la parte superior del basidio y empiezan a formar los primordios de las basidiosporas. Seguidamente se da el paso de la migración de los núcleos hacia las basidiosporas jóvenes, que continúan su desarrollo como células uninucleadas, haploides (Alexopoulos, 1962; Romero, 1988).

2.1.3. Ciclo de vida de los hongos Basidiomycetes.

El ciclo de vida en general de los basidiomycetes inicia con la germinación de las basidiosporas para formar micelio monocariótico haploide. Todos los núcleos tienen el mismo genotipo. El núcleo no se fusiona; en lugar de esto ocurre migración nuclear y el micelio llega a ser dicariótico ($n + n$), teniendo 2 núcleos genéticamente diferentes en el mismo citoplasma. Típicamente, el núcleo de el dicarion ocurre en pares y la mitosis ocurre simultáneamente. Este es una fase del hongo que es única en la biología. Finalmente el basidio se desarrolla; ocurre fusión nuclear (Cariogamia) seguida inmediatamente por meiosis. El ciclo se completa cuando se forman de nuevo las basidiosporas sobre el basidio (Griffin, 1994), (Figura. 2).

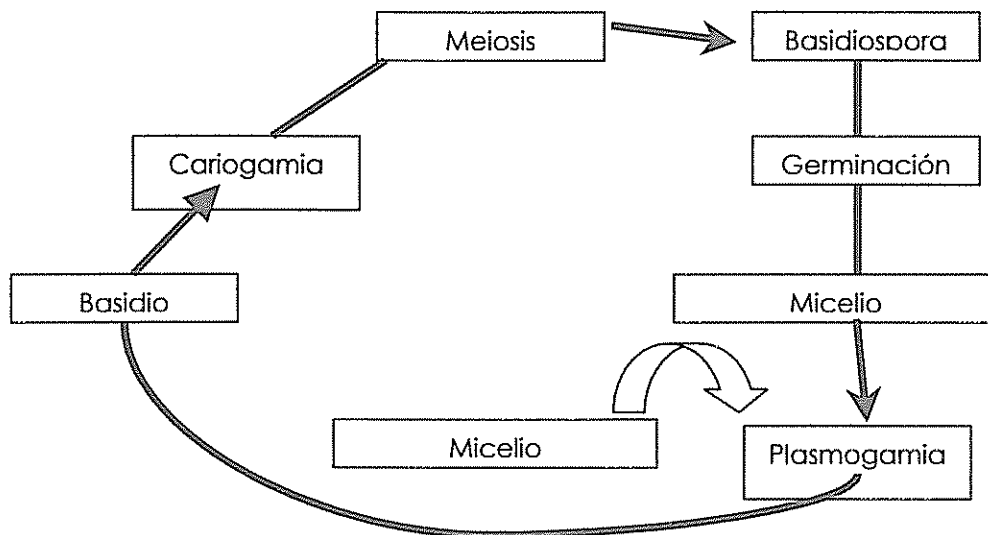


Figura 1. ciclo de vida general de hongos Basidiomycetes

2.1.4. Descripción morfológica.

El micelio de *M. citricolor* consiste de hifas hialinas bien desarrolladas, septadas y profusamente ramificadas: de color blanco, amarillo o anaranjado, que frecuentemente crece en forma de abanico. En algunas especies, varias hifas paralelas pueden unirse y formar cordones gruesos de micelio, llamados "Rizomorfos" (Romero, 1988).

Bonilla (1980), describe el crecimiento del micelio del hongo *in vitro*, el cual es de coloración blanca y algodonosa, con crecimiento irregular; es decir no del todo radial, el cual no colorea el sustrato. Las hifas son de forma irregular, distinto grosor y en su interior se observó estructuras que asemejan burbujas de aire. Lo cual coincide con Vargas (1990), quien menciona que el micelio de *M. citricolor* en medio de cultivo también es de color blanco. Además, menciona que las hifas son septadas y binucleadas.

Algunos científicos han reportado que tanto el micelio como las gemas producen luminocencia, aunque dicha emisión de luz se presenta sólo durante el crecimiento activo del hongo (Buller y Vanterpool, 1926). Otros autores también han mencionado la presencia de luminocencia en el micelio como es el caso de Carvajal (1939), quién la consideró una característica primordial del micelio.

Dicha luminocencia está asociada a la producción de varios compuestos: a) la adenosina dinucleótico (HADH) y el fosfato de adenosina dinucleótico (HADHP); b) un electrón receptor; c) la deshidrogenasa soluble; d) oxígeno molecular; y e) la enzima luciferasa. La bioluminiscencia ocurre cuando un pequeño sustrato orgánico, "luciferina" es oxidado en presencia de oxígeno. Este proceso es catalizado por la enzima "luciferasa". Y el exceso de energía es disipada en forma de luz. (Griffin 1994).

2.1.5. Reproducción

M. citricolor produce 2 cuerpos fructíferos: la gema o cabecita que corresponde al estado asexual y el basidiocarpo que es la forma perfecta o estado sexual del hongo. El basidiocarpo es una pequeña estructura en forma de sombrilla de color amarillo intenso, tiene un diámetro de 0,5 a 1 mm (Mercadal y Portillo 1990), es más grande que la gema, produce y libera una gran cantidad de basidiosporas (Maublanc y Rangel 1914).

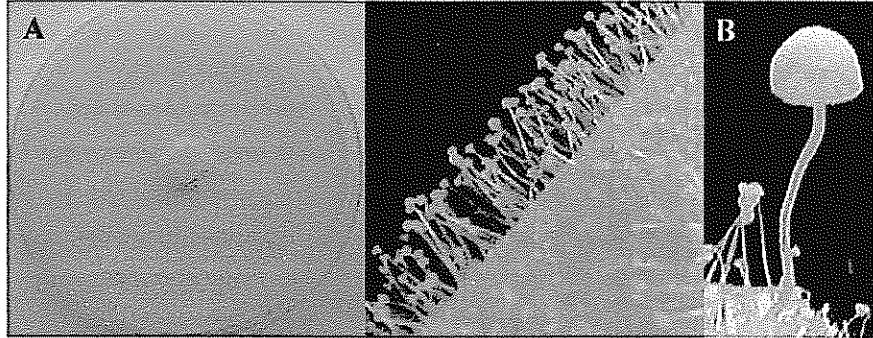


Figura 2. Representación de la estructura asexual “gema” en medio de cultivo (A), y la estructura sexual “basidiocarpo” (B) en el hongo *M. citricolor*.

Según Carvajal (1939), este hongo se propaga por basidiocarpos que crecen en la vegetación rastrera de cafetales descuidados y en el monte cercano a los ríos, aunque es frecuente esta forma, es difícil de observar (Wang y Avelino, 1999). Las estructuras asexuales conocidas como gemas o cabecitas son el principal medio de diseminación del hongo. Las cuales son dispersadas por el agua de lluvia, viento, pájaros, murciélagos, insectos, animales y personas, entre otros, a otros tejidos verdes sanos, causando nuevas infecciones y propagándose así la enfermedad (Carvajal, 1939). Dichas estructuras están situadas sobre delgados tallitos reunidos hasta en 20 unidades por mancha, constan de dos partes: un pedicelo y una gema o cabecita, la gema se desprende fácilmente cuando está madura. El pedicelo posee una longitud de aproximadamente 2-3 mm y la gema tiene un diámetro entre 0.25-0.35 mm. La gema es de color amarillo tiene forma de “perilla de puerta”. Además, posee bordes muy redondeados, la cara superior es esferoidal y la inferior tiene en el centro un punto entrante que es donde se inserta el pedicelo que la sostiene. La consistencia de la gema es sólida y el espacio entre las células está cubierto por un mucílago transparente, que permite a la gema adherirse a la hoja. (Buller 1934; Carvajal 1939; Vargas *et al.* 2000).

2.1.6. Efecto fisiológico en las gemas infectivas

Según Rodríguez (1965); Rodríguez y Arny (1967), la máxima producción de gemas y del pigmento amarillo de las mismas, se da cuando el hongo se expone a longitudes de onda de 310-400 nm. Por lo tanto, se considera que ambas formas de reproducción basidiocarpos como gemas necesitan de luz y aireación para su desarrollo en medio de cultivo (Vargas *et al.* 1990). Diferencias

en la luminocencia de aislamientos de esporas individuales de *Mycena galopus* y *Mycena polygramma* demostraron que existe una variabilidad natural relacionada con la intensidad de la luminocencia liberada, la cual está controlada por un gen dominante (Griffin, 1994).

Buller (1934), observó que cultivos de *M. citricolor* en oscuridad crecían normalmente, pero no producían gemas durante semanas. Una vez que estos cultivos fueron expuestos a luz, numerosas gemas aparecieron, no solamente sobre el micelio utilizado como inóculo, si no también sobre el nuevo crecimiento. De estas observaciones él concluye que la formación de las gemas es iniciada por estímulos de la luz.

2.1.7. Síntomas y daños.

Los síntomas de la enfermedad se caracteriza por la aparición de manchas circulares u ovaladas sobre las hojas, de 0,5-1 cm de diámetro. Las lesiones se inician como puntos café oscuro de borde indefinido, al alcanzar su tamaño final presentan un borde bien marcado con poca o ninguna clorosis alrededor, con el centro de color café claro grisáceo o café rojizo (Vargas et al. 1990). El tejido de la lesión es de consistencia papelosa y seca, a veces se rompe y se cae. El micelio penetra profundamente en el parénquima de la hoja y comienza su actividad al modificar las células constitutivas y transformar la clorofila. Si las condiciones ambientales son favorables, después de 8 – 20 días de originada la lesión se observan las fructificaciones del hongo (Carvajal, 1939).

El modo de penetración del hongo fue observado por Rao y Tewari (1987), observaron la presencia de ácido oxálico sobre cristales tetrahédricos perfectos compuestos de oxalato de magnesio, tanto en los puntos de infección como en el tejido necrótico, por lo que se sugirieron que estos cristales jugaban un papel importante en la patogénesis del hongo. El ácido oxálico es liberado por el hongo antes de la penetración sobre el tejido de la planta donde el calcio de las paredes celulares es capturado, de esta manera el tejido se debilita y permite la entrada de la hifa, y posteriormente el desarrollo del patógeno.

Una hoja puede presentar más de 50 manchas, pero la caída de la hoja depende de la posición de las lesiones, una sola lesión en la nervadura central y cerca del pecíolo basta para la caída de la hoja (Mercadal y Portillo 1990). Cuando estas manchas se forman a lo largo de una nervadura principal, toman una forma alargada en el sentido de la nervadura (Vargas et al. 1990).

El patógeno también puede atacar ramas jóvenes y frutos (Wang y Avelino 1999). La lesión en el tallo puede cubrirlo todo, provocando la muerte de la parte terminal. Además, las manchas en los tallos tiernos presentan una forma más o menos alargada (Arroyo, 1975). En caso de frutos jóvenes el micelio del hongo penetra fácilmente todos los tejidos interiores, causando serios daños (Vargas *et al.* 1990). Las manchas en el fruto tienen el mismo color que las manchas en las hojas y en general forma circular, y pueden abarcar más de la mitad del grano; el tejido se torna reseco, hundido y se adhiere a la semilla.

El principal daño que causa el ojo de gallo a las plantaciones de café es la defoliación, disminuyendo notablemente el área fotosintética. Los cafetos defoliados ocupan sus reservas alimenticias en la producción de nuevo follaje y no en la producción de frutos. Además, los pocos frutos formados son atacados también por la enfermedad, de tal forma que se vuelven muy susceptibles a la caída (Bonilla, 1980).

2.1.8. Epidemiología

Según Carvajal (1939), esta enfermedad se encuentra más extendida en los lugares con mayor altura, con abundantes lluvias, neblinas y baja temperatura, en los sitios cercanos a corrientes de agua y en aquellos donde, por circunstancias especiales, está protegido de los vientos y prevalece una atmósfera húmeda. Se ha demostrado que este patógeno del café necesita altos niveles de humedad para infestar nuevas hojas y fructificar.

En Costa Rica, la máxima infección ocurre de septiembre a octubre, lo cual coincide con los meses de mayor precipitación. La enfermedad decrece en diciembre y los niveles más bajos se presentan de febrero a mayo, que es la época más seca del año. Sin embargo, en algunas áreas, especialmente cerca de zonas boscosas, puede haber un fuerte rocío, que permite que la enfermedad continúe su desarrollo aún durante este período (Wang y Avelino 1999).

Estudios hechos en el Salvador por Bonilla (1980) y en Guatemala por Avelino *et al.* (1995), demuestran que las regiones donde esta enfermedad ataca con mayor intensidad presentan fluctuaciones estacionales de la lluvia y humedad relativa. Las temperaturas entre 18° y 24°C, precipitaciones anuales de 2,000 a 4,000 mm y uno o más meses del año sin excesos de agua, favorecen al patógeno. Por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad no depende únicamente de la temperatura si no también de la humedad relativa del ambiente (Bonilla 1980).

Cuando las lluvias inician, el número de hojas enfermas y el número de lesiones por hoja aumentan rápidamente. Poco tiempo después se desarrollan las cabecitas o gemas que, una vez maduras, son desprendidas de su pedicelo y acarreadas por las gotas de lluvia a hojas cercanas (Wang y Avelino 1999). La diseminación por el agua de lluvia es relativamente lenta y una cabecita rara vez es transportada a más de medio metro de distancia, a no ser que vientos fuertes acompañen las lluvias. Además, la diseminación a largas distancias puede ocurrir cuando las cabecitas se adhieren a insectos, pájaros o trabajadores. El transporte hacia ramas superiores es menos frecuente, por lo que generalmente, son las partes bajas de la planta las más afectadas. (Curling 1986).

2.2. Procesos que producen variabilidad en los hongos fitopatógenos.

La evolución de una población involucra procesos concomitantes de diversificación y diferenciación, además de división de la variación genética. La variación puede ser introducida a una población a través de la mutación, la recombinación y la migración, mientras que la variación existente es dirigida por los procesos de selección y deriva genética (Leung *et al.*, 1993).

2.2.1. La Mutación

La frecuencia de mutación en el material genético de los organismos generalmente es baja, se ha estimado que los factores de virulencia de los hongos fitopatógenos varían en diferentes órdenes de magnitud; en términos generales se ha encontrado que las tasas de mutación medidas en loci morfológicos y de enzimas para algunos hongos, están alrededor del orden de 10^{-6} (McDonald *et al.*, 1989).

2.2.2. Selección Natural

Entre todas las fuerzas evolutivas, la selección impuesta por la planta hospedera juega el papel más importante en la conformación de la estructura poblacional de un hongo fitopatógeno. Esta es debida principalmente a la naturaleza artificial de un agroecosistema en el cual la resistencia a la enfermedad en el hospedero es introducida periódicamente, imponiendo una fuerte selección hacia nuevas virulencias (Leung *et al.*, 1993).

En un patógeno que se reproduce asexualmente, la población consiste de diferentes linajes clonales, es decir, líneas poblacionales muy homogéneas (Goodwin *et al.*, 1995), una vez la

combinación favorable de genes ha evolucionado, la reproducción asexual y la selección aseguran el mantenimiento y rápida diseminación de una combinación particular de genes. En una población que se reproduce sexualmente, puede adquirir simultáneamente mutaciones múltiples favorables a través de la recombinación (McDonald *et al.*, 1989).

Clay y Kover (1996), plantean como en el proceso de selección, algunos hongos fitoparásitos pueden llegar a disminuir el vigor de sus plantas hospederas, reduciendo el potencial para la producción de prole genéticamente variable y resistente a su infección; además, los genotipos hospederos susceptibles a la infección por el patógeno pueden llegar a ser perpetuados por las poblaciones de este a través de la inducción de reproducción asexual (relativamente homogénea) de sus plantas hospederas.

2.2.3. La Recombinación

La recombinación incrementa la diversidad genética en las poblaciones desintegrando las combinaciones de genes existentes y permitiendo la formación de nuevas combinaciones. Cuando surgen nuevos mutantes, ellos necesariamente están en desequilibrio con otros loci. Si estos mutantes son fuertemente seleccionados, como puede esperarse para una situación de virulencia, entonces los alelos en otros loci que están asociados con los nuevos mutantes, también se incrementarán en frecuencia. (McDonald *et al.*, 1989).

2.2.4. El Flujo de Genes

Otro factor crítico que influencia la variabilidad genética de un patógeno es el flujo de genes; este puede ser definido como el intercambio de genes entre poblaciones (Slatkin, 1985), o como el movimiento de gametos, individuos y poblaciones en una escala geográfica. El flujo de genes conjuntamente con otras fuerzas evolutivas, puede dar como resultado el esparcimiento de genes individuales (o secuencias de DNA), genotipos, y aún el establecimiento de poblaciones enteras en regiones diferentes (McDermott y McDonald, 1993).

2.2.5. La Deriva Genética

Se debe considerar el papel de la deriva genética en la explicación de una estructura poblacional observada. La deriva genética se define como el cambio en la frecuencia genotípica o génica debida a una sola oportunidad. También se ha definido como el muestreo aleatorio de gametos entre generaciones en poblaciones finitas que da como resultado fluctuaciones aleatorias en la frecuencia de genes. Este proceso es considerado generalmente como una fuerza débil que actúa disminuyendo la variación genética dentro de poblaciones, por medio de la fijación de alelos. El efecto es grande en poblaciones pequeñas y bajo en poblaciones grandes (McDonald *et al.*, 1989).

2.3. Caracteres morfológicos.

Los caracteres morfológicos fueron los únicos disponibles durante muchos años para detectar y estimar variabilidad genética. Estos permitieron organizar taxonómicamente muchas especies. Además, se construyeron mapas genéticos para diferentes organismos. Algunos de los inconvenientes que presentan los caracteres morfológicos son: necesario esperar a que los organismos lleguen a su etapa adulta para conocer su fenotipo, su número es limitado, generalmente son de expresión dominante, frecuentemente enmascarados por efectos epistáticos y muy influenciados por el ambiente (Arús, *et al.*). Además, el caso de especies pequeñas como plantas sin flores (musgos y algas) y también hongos, es muy difícil encontrar un número suficiente de caracteres morfológicos para un estudio sistemático. Sin embargo, durante muchos años la principal herramienta utilizada por los investigadores fue el uso de estos caracteres.

Wang (1988), estudio la variabilidad de *M. citricolor* a partir del crecimiento del micelio, producción de gemas, capacidad de formar estado perfecto, compatibilidad o incompatibilidad, producción de ácido oxálico y el desarrollo de lesión. A partir de estos caracteres observó dos grupos, uno formado por todos los aislamientos provenientes de *Coffea liberica* L. y el otro que incluía aislamientos de *C. arabica* y *C. canephora*

Gibbs y Brasier (1973) citado por Marshall *et al* (1981), clasificaron de forma natural aislamientos de *Ceratocystis ulmi* provenientes de Inglaterra, uno de crecimiento rápido y esponjoso y el otro de lento crecimiento. Estas características fueron relacionadas con la virulencia de los aislamientos y en condiciones de laboratorio la morfología era muy estable. Esto no parece ser típico de otros hongos fitopatógenos, por ejemplo aislamientos de *Fusarium oxysporum*, *Verticillium alboatrum*, y

V. dahliae gradualmente produjeron cambios en su morfología o sectores morfológicos diferentes, lo cual podría ser una de las mayores limitaciones para la utilización de los caracteres morfológicos. Por el contrario, diferentes métodos de análisis molecular permite determinar un número ilimitado de marcadores que no están sujetos a las condiciones ambientales (Weising et al. 1995).

2.4. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son herramientas para los análisis genéticos o moleculares que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y ácidos nucleicos (ARN y ADN). Han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como, estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés (Otero *et al.* 1997).

En sentido más estricto, los marcadores moleculares son segmentos de ADN que se consideran como puntos de referencia para el análisis del genoma. Estos segmentos usualmente representan variantes o sitios polimórficos que pueden ser identificados empleando estrategias generales tales como hibridación molecular o amplificación enzimática del ADN (Caetano-Anollis 1993).

Los marcadores moleculares son útiles para analizar la diversidad genética de plantas, animales y microorganismos, entre ellos hongos fitopatógenos. A la fecha se han realizado varios estudios de diversidad de patógenos, como es el caso de *Lycopersici* spp (Fol) y *Radicis-lycopersici* (Forl) de *Fusarium Oxysporum* (Carbonell, 1994). Otro ejemplo es el hongo *Alternaria alternata* que ataca el cultivo del tomate, donde se observó un alto nivel de diversidad genética entre 69 aislamientos del hongo recolectados a lo largo del estado de California. Se determinaron dos grupos genéticos, el primer grupo con 55 aislamientos y el segundo con 14 aislamientos. (Morris et al. 2000).

2.4.1. RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar).

Esta técnica ha sido muy utilizada a partir de 1990, cuando dos grupos de investigación (Williams *et al.* 1990; Welsh y McClelland 1990) independientemente describieron un ensayo de polimorfismo a nivel del ADN utilizando el principio PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un procedimiento *in vitro* para la amplificación enzimática de un segmento específico de ADN (Rodríguez, 1992). El primer grupo de investigación de la compañía Dupont (Williams, *et al.* 1990) lo llamó ensayo de RAPD (Técnica del ADN amplificado

al azar) y el otro grupo del Instituto de Investigación Biológica de California (Welsh y McClelland, 1990) llamó al ensayo AP-PCR (Amplificación al azar de la reacción en cadena de la polimerasa).

La modificación de la técnica PCR que dio origen al RAPD, se logró al sustituir el uso de un par de oligonucleótidos ("Primer", iniciadores o cebadores) largos, por un solo "primer" corto y con la capacidad de unirse a muchos loci diferentes (Waugh y Powell, 1992). Para iniciar la amplificación de un patrón genómico se requiere de un oligonucleótido "primer", el cual se une a sitios específicos en las cadenas opuestas del ADN previamente desnaturalizado del organismo en estudio. Si existen diferencias en una o ambas hebras donde deben insertarse los "primers", se da como resultado la no amplificación de la banda (Welsh y McClelland 1990 ; Williams *et al.* 1990).

RAPD, es un marcador dominante, o sea, que la aparición de una banda implica que existe una homología con el "primer", todos los demás alelos que no son homólogos al sitio de unión con el "primer" no se amplifican. La naturaleza de los fragmentos amplificados están fuertemente influenciados por las secuencias del ADN del organismo en estudio y las del oligonucleótido (Welsh y McClelland 1990 ; Williams *et al.* 1990). Esta técnica es muy utilizada en la obtención de *fingerprints* genómicos de individuos, variedades y poblaciones; en el análisis de estructuras y diversidad genética en poblaciones naturales, poblaciones de mejoramiento y bancos de germoplasma. Además, permite establecer relaciones filogenéticas y construir mapas genéticos (Cornide 1998).

La técnica también es utilizada en patógenos, por ejemplo el hongo *Fusarium oxysporum* que ataca al cultivo del pepino, ha sido caracterizado según su patogenicidad, compatibilidad vegetativa y diversidad genética (González 1998). Asimismo, 59 aislamientos del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* causante de la antracnosis en el cultivo del frijol en México, fueron agrupados en 10 patotipos con esta misma técnica (Vakalounakis et al. 1999).

Délye (1997), determinó la variabilidad genética a partir de aislamientos del patógeno *Uncinula necator* causante del moho polvoso en el cultivo de la uva en Europa y la India. El estudio confirmó la existencia de dos biotipos de *U. necator*. El primero presentó forma de micelio, con capacidad de sobrevivir en estado de dormancia sobre el primordio de la hoja y es causante de fuertes esporulaciones infecciosas. Mientras que el segundo biotipo presentó forma de "cleistotecio", con la capacidad de sobrevivir dentro de la corteza del arbusto. Ambos biotipos permiten al patógeno sobrevivir durante la época de invierno. Un mejor conocimiento de la biología del patógeno y

epidemiología de esta enfermedad ha permitido desarrollar una estrategia de manejo integrado para combatir la enfermedad.

Perry y Desjardin (2001) estudiaron el género *Mycena* a partir de 450 colecciones procedentes de California, con el objetivo de elaborar una encuesta taxonómica para identificar las diferentes especies en todo el estado. Como resultado obtuvieron 56 especies de *Mycena*, distribuidas en 24 sitios. Además, identificaron 15 especies nuevas para California y 4 especies nuevas que no habían sido publicadas.

2.4.2. Proceso para el análisis RAPD

Para llevar a cabo el análisis RAPD se requiere de los siguientes cinco elementos básicos (Phillips *et al.* 1995):

- a. **ADN molde:** es el ADN de doble cadena proveniente del organismo que se quiere analizar.
- b. **“Primer” o cebador:** oligonucleótido, o sea, un segmento corto formado por una cadena simple de nucleótidos con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Los “primers” más comúnmente usados poseen una longitud de 10 nucleótidos y deben tener un contenido de al menos un 50 % de Guanina-Citocina para funcionar correctamente.
- c. **Desoxinucleótidos:** se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena.
- d. **Solución “tampón”:** las soluciones deben contener concentraciones óptimas de iones potasio y magnesio y ser calibrada generalmente a un pH de 8,4.
- e. **Taq-polimerasa:** es la enzima ADN-polimerasa termoestable extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* (Erlich 1989). Esta enzima tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN mediante su síntesis a partir de un punto determinado fijado en este caso por el “primer”.

Durante todo el análisis RAPD se da una serie de reacciones químicas en forma cíclica, las cuales involucran tres fases que son definidas por cambios en la temperatura (Innis *et al.* 1990).

1. La primera fase es la desnaturalización del ADN que ocurre entre 93-95°C, en este momento las dos cadenas se separan y permanecen en suspensión hasta que la temperatura se reduce.
2. Luego ocurre la unión con el “primer” a 35°C, en sitios complementarios de la cadena disociada.
3. Finalmente la síntesis del segmento complementario de la cadena en una dirección específica (5' a 3') a partir de la unión del “primer” de reacción, se produce mediante la acción de la polimerasa y la presencia de desoxinucleótidos libres en la solución y otros elementos minerales como el magnesio y el potasio, esta fase se produce a 72°C.

Estas tres fases constituyen un ciclo completo de amplificación el cual se repite entre 40 y 50 veces bajo condiciones que semejan a las que ocurren en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), logrando la amplificación exponencial de varios fragmentos de ADN (Innis et al, 1990).

Los fragmentos sintetizados son los marcadores RAPD y se visualizan al someter a electroforesis en un gel de agarosa las muestras de ADN, luego son coloreados con bromuro de etidio para ser visualizados con la ayuda de luz ultravioleta. Se espera que genotipos diferentes produzcan fragmentos también diferentes, razón por la cual pueden ser utilizados como marcadores moleculares (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.* 1990).

La técnica RAPD a diferencia de otras utilizadas, presenta ventajas como: simplicidad, rapidez, no necesita de equipos caros, requiere de una pequeña cantidad de ADN crudo (10 ng), se puede replicar todo el genoma, usa nucleótidos al azar y el costo en que se incurre es notablemente menor si la comparamos con técnicas como RFLP (Carlson et al. 1991; Rafalski et al. 1991; Waulgh y Powell, 1992). Además, tiene la ventaja de no usar sondas radioactivas que son muy perjudiciales para las personas (Rafalski *et al.* 1991). Para aplicar la técnica RAPD no se necesita conocer la información de la secuencia del DNA del genoma que será estudiado y detecta gran cantidad de polimorfismos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Esta técnica tiene como principal desventaja el bajo contenido de información genética por locus. Sólo un alelo es detectado, el segmento que es amplificado, mientras que las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente como un alelo nulo, a esto se le conoce como dominancia de los marcadores RAPD. Otra limitación es la repetibilidad de la técnica entre laboratorios, ya que es muy sensible a cambios en las condiciones de trabajo, obteniéndose resultados un poco diferentes

entre laboratorios. También, algunas bandas son fáciles y claramente interpretadas, mientras que otras son ambiguas (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.5. Los Sistemas de Información Geográfica: Herramienta para la referencias espaciales de la diversidad genética.

Los Sistema de Información geográfica, a los cuales se hace comúnmente referencia por medio de la abreviatura SIG, son programas de computadora que permiten manejar eficientemente datos espaciales junto con sus característica alfanuméricas asociadas; esto es, manipulan información de localización (Primer, 2001).

Los paquetes de SIG han evolucionado como programas de manejo de información gráfica apoyada por una base de datos; algunos incorporan algún tipo de lenguaje con el cual se puede crear rutinas que manipulen la información. En el extremo más avanzado se encuentran los sistemas expertos, capaces de sugerir las acciones más apropiadas para solucionar un problema particular (Barret y Curtis, 1992).

En todo sistema de información geográfica se utiliza un modelo encargado de representar de manera simplificada determinados aspectos de la realidad. Implícitamente se desecha la información que se considera de poco valor; por esta razón el modelo más apropiado varía según los requerimientos que dependen no solo del tipo de problema a resolver, sino también de las capacidades del equipo con las que se cuenta. Por ejemplo, existen modelos que pueden representar mucho mejor la realidad que otros, pero a cambio requieren una mayor cantidad de recursos (mayor tiempo de cómputo, mayor cantidad de memoria, etc.)

Los dos principales modelos con los que se representan las entidades espaciales son los modelos vectoriales y Raster. En el modelo vectorial se apoya actualmente las dos formas de representar datos espaciales tridimensionales conocidas como Modelo de elevación digital (DEM) y Red irregular de triángulos (TIN) (Primer, 2001).

La más grande aplicación de SIG en cultivos vegetales, está referida a la modelación. Esto es, la estimación de rendimientos de los cultivos a partir de modelos que incluyen manejo de la información por SIG, como suelos y clima, ya sea por medio de interfases o directamente en los programas para la aplicación de SIG (Han et al, 1995), como ARC/INFO o ARCVIEW. También

puede encontrarse literatura que reporta el uso de los SIG en el establecimiento de áreas óptimas para cultivo o para el estudio de adaptación de nuevos cultivares (Pollak, 1993).

La literatura reporta mayormente el uso de los SIG para el estudio y conservación de los Recursos Fitogenéticos. En general para referencias espaciales de variabilidad genética estudiada por marcadores de ADN, las referencias bibliográficas son muy escasas o no están disponibles; para el caso particular de variabilidad genética en hongos, esta es prácticamente inexistente.

3. METODOLOGIA

El estudio se realizó en 4 etapas: A) recolección del hongo *M. citricolor* en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica B) Análisis morfológico C) Análisis molecular D) tabulación y organización de los datos meteorológicos.

3.1. Recolección de muestras en el campo.

Se colectaron muestras de *M. citricolor* en 25 zonas, con el fin de obtener la mayor representación del hongo en las zonas cafetaleras de Costa Rica. Además, se incluyó un aislamiento de *M. citricolor* que fue facilitado con la ayuda del Instituto Hondureño del Café (IHCAFE), para un total de 26 aislamientos. En la figura 3 se indica los sitios que fueron muestreados en Costa Rica.

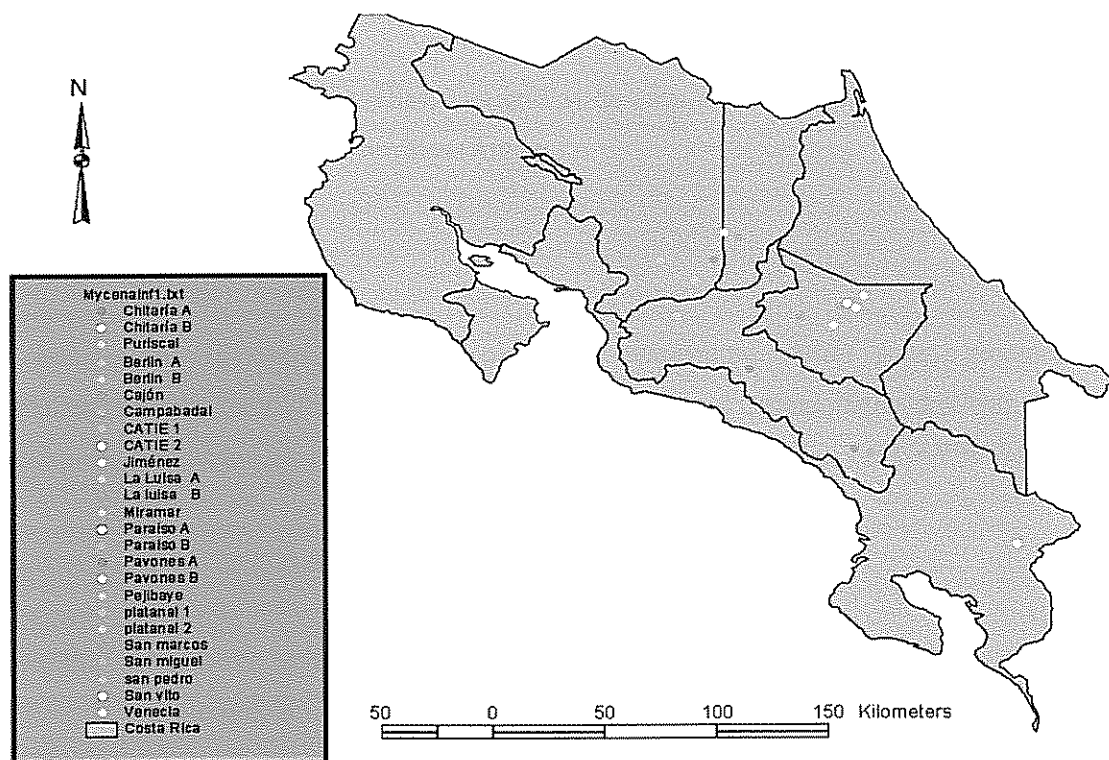


Figura.3. Ubicación geográfica de cada una de las muestras tomadas en Costa Rica .CATIE, 2001.

De la zona de Sarchí, Berlín, Paraíso, Pavones y Chitaría, se tomaron dos muestras, de tal forma que se obtuvo 2 aislamientos que provenían de un mismo sitio. Todos los sitios de muestreo fueron seleccionados por presentar condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad y por ser conocidos por los altos niveles de severidad. En cada uno de los sitios de muestreo se localizaron los focos de infección más importantes para coleccionar la mayor cantidad de hojas infectadas. La muestra se tomó en el tercio inferior de la planta y se seleccionaron hojas con lesiones nuevas para facilitar la germinación del hongo durante la etapa de laboratorio.

Al momento de la colecta del material en el campo, las hojas fueron colocadas en una bolsa con papel toalla húmeda para evitar la deshidratación, se identificó el material por sitio de muestreo y se transportaron en una hielera hasta el laboratorio de fitopatología del CATIE. Las muestras recolectadas en Costa Rica fueron llevadas el mismo día al laboratorio, pero en el caso de la muestra de Honduras, está fue recolectada por el personal de IHCAFE y enviada a Costa Rica en plato petri con medio agar de papa dextrosa (PDA).

3.1.1. Caracterización del sitio

Se registró la información geográfica, topográfica de cada sitio de colecta de *M. citricolor*, para conocer el historial de cada uno de ellos (Anexo 1).

3.1.2. Datos meteorológicos

La información climática obtenida incluyó la temperatura, brillo solar, precipitación y evapotranspiración. La información se obtuvo de las estaciones meteorológica de Costa Rica. Estos datos fueron facilitados por medio del sistema de información geográfica del CATIE (SIG).

3.2. Investigación de laboratorio

El estudio molecular se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología. El estudio morfológico se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Manejo Integrado de Plagas (MIP). Ambos laboratorios están ubicados en el CATIE, Turrialba, Costa Rica.

3.2.1. Aislamiento y multiplicación del hongo en el laboratorio.

Las muestras de hojas infectadas se lavaron con agua destilada para eliminar todas las posibles impurezas provenientes del campo. Luego, se limpiaron con un algodón impregnado con alcohol al 95% y finalmente se lavaron de nuevo con agua destilada. Finalizada esta etapa, se colocó dentro de una caja plástica de 30 x 21 x 7 cm una espuma esterilizada húmeda, seguidamente se colocaron las hojas infectadas y se agregó vaselina a los bordes de la caja para luego sellar con una tapa de vidrio y así formar una cámara de humedad que permitiera estimular el desarrollo de las gemas infectivas.

Una vez producidas las gemas o estructuras asexuales, estas fueron colocadas sobre medio de cultivo para su multiplicación, el medio estaba constituido por agar, papa y dextrosa (PDA) a una proporción de 39 gramos (PDA) por litro de agua, más 5 gramos de agar y pH de 4.5. El medio fue esterilizado en autoclave por 25 minutos a una temperatura de 140°C y una presión de 15 lb/pulg². Después de haber esterilizado el medio, este se adicionó a los platos petri. Además, se agregó ácido láctico en una proporción de 50 gotas/l de medio para disminuir la presencia de bacterias. Los platos petri inoculados con gemas, se colocaron en una incubadora a una temperatura de 22 °C, un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad para estimular el crecimiento del hongo.

3.3. Estudio morfológico.

El estudio morfológico se realizó a partir de 26 aislamientos, 25 prodecentes de Costa Rica más un aislamiento procedente de Honduras. De cada aislamiento se tomó discos de 2 mm de diámetro de papa dextrosa agar (PDA) con el patógeno en crecimiento activo y procedente de un cultivo de 2 semanas de edad, el disco se colocó en el centro del nuevo plato con el sustrato, se preparó 4 platos por cada aislamiento, para luego iniciar con las evaluaciones.

3.3.1. Diseño experimental

El diseño estadístico utilizado fue un irrestricto al azar, con 26 tratamientos (aislamientos) y 4 repeticiones, las unidades experimentales fueron cada uno de los platos petri. De tal forma que todas las unidades experimentales se evaluaron en condiciones homogéneas de temperatura, luminosidad y cantidad del medio de cultivo (PDA). Además, las mediciones fueron realizadas con la ayuda de un estereoscopio marca ZEIS en unidades micras y luego transformadas a milímetros.

El modelo estadístico contempló únicamente 2 fuentes de variación (los tratamientos y el error) y la media de la población (μ).

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

Y_{ij} = variable de respuesta del i ésimo tratamiento en la j ésima repetición

μ = media general

t_i = efecto del i ésimo tratamiento desde $i = 1$ hasta $j = 26$

ϵ_{ij} = error experimental asociado en el i ésimo tratamiento en la j ésima repetición desde $i = 1$ hasta $j = 104$

3.3.2. Variables evaluadas

El análisis morfológico incluyó variables cualitativas y cuantitativas. Las cuales se detallan a continuación:

Variables cualitativas	Variables cuantitativas
1- Color del micelio	1- Diámetro de la colonia (mm)
2- Color de la gema (estructura asexual)	2- Diámetro de la gema (mm)
3- Patrón de crecimiento del micelio	3- Longitud del pedicelo de la gema (mm).

La variable cuantitativa de diámetro de la colonia (mm), fue evaluada a los 2, 4, 6 y 8 días después de la inoculación. Las variables cualitativas de patrón de crecimiento del micelio y color del micelio fueron evaluadas a los 10 días después de la inoculación. La longitud del pedicelo (mm) y el diámetro de la gema (mm), así como también la variable cualitativa de color de gemas fueron evaluadas a los 20 días después de la inoculación.

La variable cualitativa de color de gema y color de micelio se evaluó a partir de la tabla de colores de Munsell (1977), la cual sirvió como parámetro de referencia para los datos obtenidos. La variable patrón de crecimiento fue evaluada de forma descriptiva en una tabla que dividía y agrupaba a cada uno de los aislamientos analizados.

El análisis de los datos cuantitativos se realizó con el programa computacional SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (1999) en el orden que se describe a continuación:

El análisis de varianza se realizó con el procedimiento GLM de SAS para conocer si existían diferencias significativas entre cada uno de ellos. Además, se estimó la variabilidad existente entre las procedencias de todos los aislamientos entre sí. Los datos cuantitativos fueron sometidos a la prueba de Duncan, con el fin conocer cuales eran los aislamientos más similares de acuerdo a sus características morfológicas. Además, se realizó un fenograma por medio del método Ward (1967), que agrupaba a los aislamientos de acuerdo a sus características cuantitativas, incluyendo la variable diámetro de la colonia y las variables ausencia y presencia de gema y pedicelo, creada para comparar a los 26 aislamientos ya que 10 de estos no presentaron dichas estructuras y por lo tanto no era posible comparar por la variable diámetro de gema y longitud de pedicelo.

3.4. Estudio molecular

3.4.1. Crecimiento del hongo en medio mineral y preparación de muestras para la extracción de ADN.

Las muestras utilizadas en la extracción de ADN se obtuvieron de los 26 aislamientos que crecieron en PDA, se extrajeron las gemas para ser inoculadas en medio mineral siguiendo el protocolo diseñado en CATIE para el hongo de cacao *Moniliophthora roreri*.¹ El procedimiento se describe a continuación:

- 1) Se preparó el medio de cultivo mineral (Anexo 2). Se colocaron 100 ml del medio mineral en un frasco erlenmeyer de 250 ml debidamente tapado con papel aluminio y autoclavado previamente por 20 minutos. Luego de haber autoclavado el medio, se agregó 200 miligramos por litro de fosfato de Streptomycin para prevenir contaminación por bacterias.
- 2) De los platos que habían sido multiplicados después de 15 días de inoculación, se tomó un plato por aislamiento, el cual mostraba un buen crecimiento y desarrollo de las gemas. Se le adicionó a cada plato una solución estéril de 20 ml de agua destilada más 12,5 µl de tween 80, para facilitar la remoción de las gemas.

¹ Wilbert Phillips, laboratorio de biología molecular, CATIE. Comunicación personal.

- 3) Con un pincel fino #12 esterilizado se removieron las gemas del hongo y se transfirió 5 ml de la suspensión a un erlenmeyer con el medio mineral. Para facilitar el intercambio de oxígeno se selló el erlenmeyer con un tapón de espuma y papel aluminio.
- 4) El erlenmeyer inoculado con las gemas del hongo se colocó por 7 días en agitación a 150 rpm, a una temperatura de 23 °C y un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad para favorecer el crecimiento del micelio del hongo.
- 5) A los 7 días se procedió a extraer el micelio del hongo producido en el medio mineral para iniciar la extracción de ADN.

3.4.2. Extracción de ADN.

El ADN del hongo fue extraído con el método MATAB (Mixed Alkyltri-Methylammonium Bromide) modificado en el laboratorio de Biología Molecular del CATIE, 2001 (Anexo 3). Este método es muy utilizado en tejidos que presentan una dureza externa en sus tejidos, como la corteza de árbol. Se seleccionó este método debido a que el micelio de *M. citricolor* una vez seco era bastante duro y presentaba gran cantidad de contaminantes como: proteína, carbohidratos. Este método permite romper la pared celular y liberar las organelas, obteniéndose ADN en cantidad y calidad para el análisis. El procedimiento se describe a continuación:

- 1) El micelio se extrajo del medio mineral con ayuda de una bomba de vacío y seguidamente se colocó en un desecador para extraer el exceso de humedad.
- 2) Una vez que el micelio estuvo seco se pesó, se tomó 20 mg del micelio seco y se colocó dentro de un mortero, se le agregó 1 ml de buffer sorbitol + bisulfito de sodio, se maceró uniformemente hasta deshacer completamente el micelio.
- 3) Se agregó un 1 ml más de buffer para lavar el residuo del mortero y se colocó toda la suspensión dentro de un tubo "ependorf" de 2 ml. El tubo "ependorf" fue agitado en un vortex para luego centrifugarlo a 14,000 RPM durante 10 minutos.
- 4) El sobrenadante fue eliminado y se agregó 800 µl de tampón MATAB.

- 5) Las muestras fueron colocadas en baño maría para iniciar el proceso de digestión durante dos horas a una temperatura de 65 °C.
- 6) Al terminar la digestión se enfriaron los tubos para luego agregar 800 µl de cloroformo alcohol isoamílico a una relación 24:1. Se agitaron y centrifugaron a 14,000 RPM durante 10 minutos nuevamente.
- 7) El sobrenadante se depositó en un tubo “eppendorf” limpio de 2 ml y se le agregó 30 µl de RNAsa a una concentración de 10 µg/µl y se digirió durante 30 minutos a 37 °C. El ADN se precipitó colocando isopropanol en el tubo “eppendorf” y agitando suavemente.
- 8) Los tubos se dejan reposar a una temperatura de 20 °C durante 2 horas. Pasado este tiempo se centrifugó nuevamente a 14,000 RPM durante 10 minutos, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se agitaron los tubos para lavar el “pellet” correctamente.
- 9) Se colocaron los tubos con las muestras boca abajo sobre papel toalla el tiempo necesario hasta eliminar el etanol.
- 10) Por último las muestras fueron suspendidas en 200 µl de agua ultrapura hasta que el residuo se disolvió totalmente. Las muestras fueron almacenadas a -20°C para su posterior utilización.

3.4.3. Determinación de la calidad y cuantificación de ADN.

Para cuantificar la concentración de ADN por muestra se realizó en gel de agarosa al 0,8% (Anexo 4). Se tomó 1 µl de la solución de ADN mas 16 µl de agua ultrapura y 2 µl azul de bromofenol. La muestra se colocó en el gel de agarosa contenido en una cámara de electroforesis y se puso a migrar los segmentos por espacio de una hora.

Para cuantificar el ADN se utilizó el marcador Fago Lambda/Hind III (SIGMA); la estimación del contenido de ADN de las muestras en estudio se realizó por comparación del grosor e intensidad de la banda que se produce después de un periodo de coloración en bromuro de etidio y visualizada mediante luz ultravioleta. De esta forma la intensidad de la fluorescencia visualizada con luz

ultravioleta se consideró proporcional a la cantidad de ADN que se presenta en la muestra evaluada.

3.4.4. Selección de "primers" y amplificación.

Para la selección de los "primers" polimórficos se utilizaron 5 muestras representativas de la población. Los genotipos fueron seleccionados considerando las distancias geográficas y su representatividad del área muestreada. Los genotipos fueron: Miramar de Puntarenas (Mir-19), Sarchí de Alajuela (Sar-5), Campabadal de Turrialba (Camp-11), Platanal de Pérez Zeledón (Plat-21) y San Vito de Coto Brus (SVit-25). Se evaluaron un total de 70 "primers" de los cuales 53 son elaborados por University of British Columbia (UBC), series 100, 200, 300, 400, 500 y 17 de la empresa Operon Technology INC. Los "primers" vienen en una presentación de 10 µg por tubo, los cuales se diluyeron en agua ultrapura, en una solución madre de 25 µM, tomando en consideración el peso molecular de cada uno de los "primers". Los "primers" fueron seleccionados a partir de su capacidad de amplificación y por el número de polimorfismos presentados.

Para el análisis RAPD (anexo 6), se utilizó el protocolo utilizado por el laboratorio de biología molecular del CATIE. El volumen final de la reacción de PCR fue de 20 µl conteniendo las siguientes concentraciones y molaridades: 1 ng/µl de ADN, 1 X de 10 X Buffer II, 2 mM MgCl₂, 0,375 µM primer, 0,2 mM DNTP, 0.04 u/µl de taq, 11,35 µl de agua (anexo 7).

La amplificación del ADN se realizó con ayuda de un termociclador PCR system 9600 fabricado por PERKIN ELMER. El programa utilizado consistió de un ciclo inicial de desnaturalización de la cadena de ADN de 1 minuto 30 segundos a 95°C, seguido por 40 ciclos compuestos por: 10 segundos a 94°C (apertura de la cadena), 10 segundos a 37°C (unión "primer"-ADN) y 1 minuto y 10 segundos a 72°C extensión de la cadena y finalmente un ciclo de 2 minutos 30 segundos a 72°C, estabilización de los productos. Finalizado el programa la reacción se dejó enfriar por 15 minutos a una temperatura de 4°C.

3.5. Análisis de datos moleculares

3.5.1. Registro de datos y generación de matriz binaria

El registro de los datos se realizó para cada uno de los individuos en estudio, considerando la presencia de la banda como (1) y ausencia de banda como (0). De la información obtenida se generó una matriz binaria con cada uno de los “primers” analizados.

3.5.2. Coeficientes de similitud y distancias genéticas

Una vez formada la matriz binaria, se procedió a generar la matriz de similitud, la cual se obtuvo a partir del coeficiente de similitud de Jaccard, 1908:

$$S: \frac{a}{a + b + c}$$

donde:

S = el coeficiente de similitud

a = el número de bandas presentes en ambos genotipos

b = el número de bandas presentes sólo en un genotipo

c = el número de bandas presentes en el otro genotipo

El índice de Jaccard (1908) no contabiliza los fragmentos que están ausentes en ambas accesiones

De la matriz de coeficientes de similitud previamente establecidos se generó la matriz de distancia genética, con ayuda del programa estadístico computacional SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (1999). La distancia genética es una función decreciente de la similitud, por lo tanto la fórmula utilizada fue la siguiente:

$$D_1 = 1 - S$$

3.5.3. Dendograma

Como resultado de la matriz de distancias genéticas se agruparon los individuos en una estructura jerárquica bidimensional, la cual se conoce como “Dendograma”, la cual permite hacer inferencias estadísticas de semejanzas o diferencias entre los individuos analizados (Martínez 1995).

El dendograma se construyó con el método Ward (1963), contenido en el programa computacional SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (1999). Se consideró cada individuo como un grupo, para luego unir a cada uno de ellos en grupos que mantienen características más similares entre ellos.

3.5.4. Prueba de X^2

Se realizó una prueba X^2 con el propósito de identificar cuales eran las bandas polimórficas que mayor aporte daban para la diferenciación de cada uno de los grupos formados. Se utilizó el programa computacional SAS Institute Inc., Cary, NC, USA (1999).

3.6. Tabulación, organización de datos meteorológicos y análisis a partir de los Sistemas de Información Geográfica (SIG).

3.6.1. Bases de datos

Se contó con tablas de referencias para:

- a. **Temperatura.** Se tabularon los datos de temperatura promedio anual de 248 estaciones meteorológicas de Costa Rica. A partir de esta base se calculó el dato de evapotranspiración potencial, por el método de Holdridge (Holdridge, 1959).
- b. **Precipitación pluvial.** Esta información se logró como isoyetas para la República de Costa Rica, 85 isoyetas.
- c. **Brillo Solar.** También esta información se obtuvo con isolíneas de brillo solar, 27 isolíneas de brillo solar. Datos proyectados.

- d. Se aprovechó una base de datos en Excel de la información de ubicación geográfica en coordenadas en Latitud y Longitud de los sitios muestreadas, con información complementaria.
- e. La información se ordenó en un mapa sin proyectar (Latitud, Longitud) de la República de Costa Rica.

3.6.2. Manejo de la Información en el programa ARCVIEW.

La información sobre datos meteorológicos, previamente tabulados, se sometió al programa ArcView como sigue:

- a. Conversión de la base de datos en Excel a una en formato de texto, la cual fue transferida Al programa ARCVIEW mediante el procedimiento de Adicionar Tabla y Adicionar Nuevo Evento. Esto se hizo sobre el mapa sin proyectar de la República de Costa Rica. Donde se ubicó cada sitio de muestreo de *M. citricolor*.
- b. Una vez ubicados los puntos de muestreo en el mapa de Costa Rica se procedió a la proyección del mapa al sistema Lambert Conformal Conica, y el Esferoide de Clarke, 1866.
- c. Se insertaron e Interpolaron las diferentes isoyetas (precipitación pluvial). Con la información nueva se estableció un mapa para relacionar las isoyetas con los grupos genéticos encontrados.
- d. De forma similar al paso anterior, se realizó un procedimiento para la interpolación de datos para Isolíneas de Brillo Solar y para la Evapotranspiración.
- e. La temperatura estaba constituida por puntos referenciados. Se procedió a preparar Isolíneas de temperatura, con el procedimiento de Create Contours. El resto de la interpolación se ejecutó de manera similar a los acápite b y c.

- f. En virtud de que las áreas interpoladas abarcaban sitios fuera de Costa Rica, o bien no incluían áreas del país, se usó un mapa proyectado de la República en formato Grid. Con esta base se procedió a intersectar cada uno de los parámetros que contenían los Grid's de Temperatura, Precipitación, Brillo solar en el mapa en formato Grid de Costa Rica. Para cada uno de los parámetros se elaboró un mapa por separado.
- g. Con la información anterior se realizó el cálculo "Map Calculator" para establecer las áreas propicias para el desarrollo de la enfermedad de Ojo de Gallo en el mapa de Costa Rica.
- h. Sobre todos los mapas realizados se sobrepuso también la variabilidad genética. Creada para agrupar a las muestras, según su proximidad genética.
- i. Se realizó en total 6 vistas, para las cuales se crearon 6 diferentes "Layouts", que contienen 6 mapas mostrando las ubicaciones de los grupos genéticos en diversos temas, los cuales se discuten en el apartado de resultados.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Aislamientos colectados

De la recolección de las muestras en el campo, se obtuvo 25 aislamientos de Costa Rica y un aislamiento procedente de Honduras. En el Cuadro 1 se detalla el lugar de origen de cada uno de los aislamientos utilizados en la investigación.

Cuadro 1. Ubicación regional de los 26 aislamientos de *M. citricolor* utilizadas en el estudio de variabilidad genética. CATIE, 2001.

CODIGO	SITIO	DISTRITO	CANTON	PROVINCIA	FINCA *
Aleg-1	Alto la legua	Barbacoas	Puriscal	San José	José Barboza
Smarc-2	San Marcos	San Carlos	Tarrazú	San José	Mata Caña
Ven-3	Venecia	Venecia	San Carlos	Alajuela	Noe Picado
Smig-4	San Miguel	San Miguel	Central	Alajuela	La Pequeñita
Sar-5	Sarchí	Sarchí norte	Valverde Vega	Alajuela	Hacienda la Luisa
Sar-6	Sarchí	Sarchí norte	Valverde Vega	Alajuela	Hacienda la Luisa
Ber-7	Berlín	San Rafael	San Ramón	Alajuela	Jorge Mora
Ber-8	Berlín	San Rafael	San Ramón	Alajuela	Jorge Mora
Par-9	Paraíso	Central	Paraíso	Cartago	Cristina
Par-10	Paraíso	Central	Paraíso	Cartago	Cristina
Camp-11	Campabadal	Central	Turrialba	Cartago	Campabadal
CAT-12	Catie 1	Central	Turrialba	Cartago	Orgánica
CAT-13	Catie 2	Central	Turrialba	Cartago	Cabiria
Pav-14	Pavones	Pavones	Turrialba	Cartago	Santa Fé
Pav-15	Pavones	Pavones	Turrialba	Cartago	Santa Fé
Jim-16	Jiménez	Pejibaye	Jiménez	Cartago	Fernando Salas
Chit-17	Chitaría	Tres Equis	Turrialba	Cartago	Guillermo Mora
Chit-18	Chitaría	Tres Equis	Turrialba	Cartago	Guillermo Mora
Mir-19	Miramar	Miramar	Montes de Oro	Puntarenas	Jorge León
Plat-20	Platanal 1	Platanal	Pérez Zeledón	San José	Bajo las Bonitas
Plat-21	Platanal 2	Platanal	Pérez Zeledón	San José	Bajo las Bonitas
Pej-22	Pejibaye	Pejibaye	Pérez Zeledón	San José	Juan Hernández
Caj-23	Cajón	Cajón	Pérez Zeledón	San José	Verde Vigor
SPed-24	San Pedro	San Pedro	Pérez Zeledón	San José	Recibidor de Caña
SVit-25	San Vito	San Vito	Coto Brus	Puntarenas	Aguas Claras
Hon-26	Honduras	Las Vegas	Buenos Aires	Santa Barbara	Las Flores

* Los nombres propios corresponden al dueño de la finca.

4.2. Caracterización morfológica.

4.2.1. Diámetro de la colonia, longitud del pedicelo y diámetro de la gema.

En el anexo 8 y 9 se presentan los resultados obtenidos de las variables cuantitativas diámetro de gema, longitud de pedicelo y diámetro de la colonia. Las observaciones cuantitativas fueron introducidas en una base de datos en donde se registraron los promedios de los valores totales obtenidos a los 8 días de evaluación para la variable diámetro de la colonia, esto debido a que las evaluaciones realizadas cada 2 días presentaron crecimientos normales sin diferencias entre cada una de las repeticiones de los tratamientos (Anexo 10). Además, se registro el promedio a los 20 días para las variables longitud de pedicelo y diámetro de la gema (Anexo 10). El resultado del análisis de varianza indicó que si existen diferencias significativas para la variable diámetro de la colonia (Anexo 11). La longitud del pedicelo y el diámetro de la gema no presentaron diferencias significativas (Anexo 12 y 13).

Debido a que se encontró diferencias significativas entre los aislamientos, se realizó un análisis de comparación de las medias de los tratamientos mediante la prueba de Duncan y se graficó estos valores para representar cuáles aislamientos mantenían una mayor o menor relación con respecto a los promedios evaluados (Figura 4).

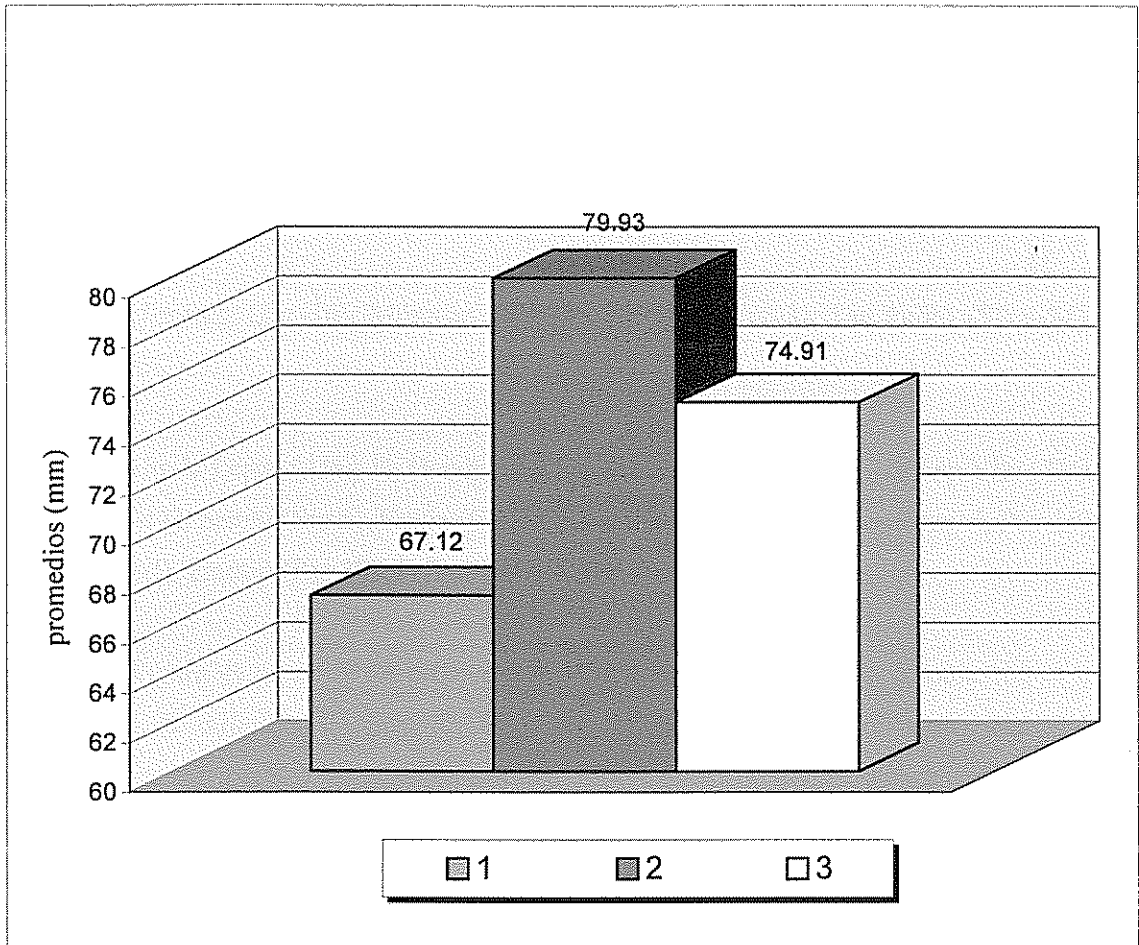


Figura 4. Diámetro de la colonia promedio a los ocho días después de la inoculación, tres grupos formados a partir de 26 aislamientos de *M. citricolor*. CATIE, 2001.

El fenograma (Figura 5), representa 3 grupos claramente definidos de acuerdo a los promedios de diámetro de la colonia y presencia – ausencia de gema y pedicelo de los 26 aislamientos evaluados:

a) Grupo 1: CATIE (CAT-12, CAT-13), Chitaría (Chit-17), Paraíso (Par-9), Platanal (Plat-20), Campabadal (Camp-11), Sarchí (Sar-5).

b) Grupo 2: Jiménez (Jim-16), Miramar (Mir-19), Venecia (Ven-3), San Pedro (SPed-24), San Marcos (Smarc-2).

c) Grupo 3: Alto la Legua (Aleg-1), Honduras (Hon-26), Berlín (Ber-8, Ber-7), San Vito (SVit-25), Chitaría (Chit-18), Sarchí (Sar-6), Cajón (Caj-23), Platanal (Plat-21), Pavones (Pav14, Pav-15), San Miguel (SMig-4), Paraíso (Par-10), Pejibaye (Pej-22).

El **grupo 1** (Figura 4) presentó un promedio de 67.12 mm diámetro de la colonia con el mayor porcentaje de disimilaridad (Figura 5). El **grupo 2** mantiene aproximadamente un 25 % de disimilaridad con respecto a los otros grupos, con un promedio de diámetro de la colonia de 79.93 mm. Finalmente, el **grupo 3** presentó el menor porcentaje de disimilaridad de los tres grupos, agrupando la mayor cantidad de aislamientos y un promedio de 74.91 mm de diámetro de la colonia (Figura 4).

Los resultados obtenidos de la variable diámetro de la colonia sugiere que el grupo 2 (Figura 4), el cual tiene el mayor promedio, se diferencia de los grupos 1 y 3 por tener una mayor capacidad de crecer en medio de cultivo, posiblemente por una mayor habilidad de transformar los nutrientes presentes en el sustrato. Los aislamientos del grupo 1 (Figura 4), el cual presentó el menor promedio, quizá es más exigentes en el contenido nutricional del medio. Por lo tanto, un menor diámetro de la colonia, puede ser el producto de un medio desbalanceado en los requerimientos nutricionales para estos aislamientos. También, es posible que las condiciones de incubación como: temperatura, humedad, pH, no sean las más adecuadas para su desarrollo. (Romero 1988).

16 aislamientos no presentaron diferencias significativas para la variable gema y pedicelo, presentando un promedio para la longitud del pedicelo de 1.11 mm y 0.24 mm para el diámetro de gema. Caso contrario, se presentó con 10 aislamientos, los cuales no presentaron gemas ni pedicelos, lo que indica que posiblemente la intensidad de luz utilizada no fue la mejor para estimular el desarrollo de las estructuras asexuales a los 20 días después de la inoculación. Esto

permite confirmar que la calidad de luz es un factor que afecta el crecimiento de las estructuras reproductivas. Por ejemplo, Buller (1934), observó que aislamientos expuestos a luz por una hora o menos eran estimulados a producir gemas, otros autores como Snyder y Hansen (1956) también observaron que las estructuras reproductivas de sepas de *Fusarium* spp sometidas a diferentes exposiciones de luz y oscuridad afectaban el tamaño y formación de los conidios.

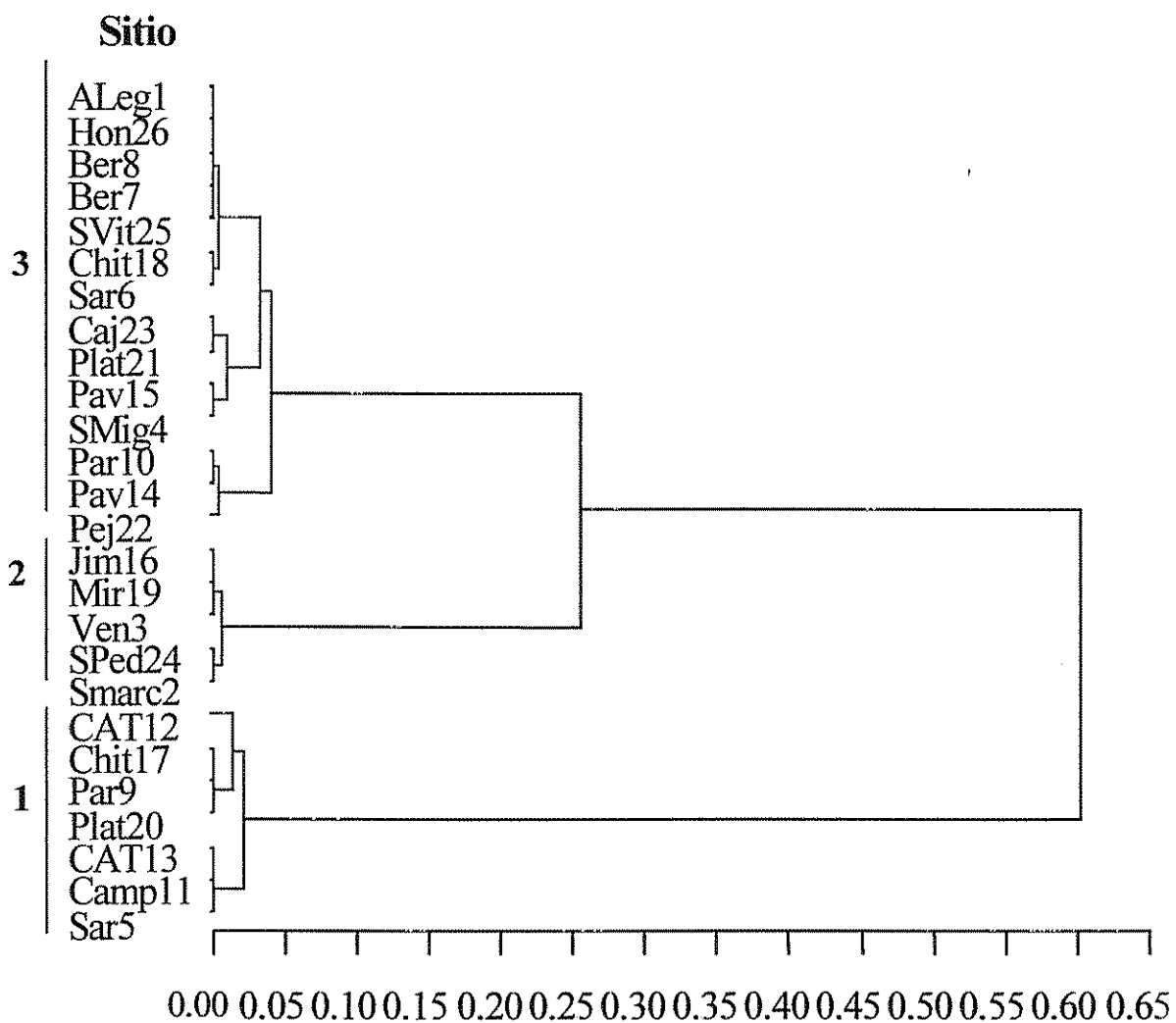


Figura. 5. Fenograma de 26 aislamientos de *M. citricolor* a partir de las variables cuantitativas de diámetro de la colonia, ausencia – presencia de gema y pedicelo, por medio del método Ward, a través del programa SAS. CATIE, 2001.

4.2.2. Coloración del micelio

El color del micelio no presentó diferencias entre los aislamientos. El micelio de todos los aislamientos fue blanco, resultado similar al reportado por Bonilla (1980) y Vargas (1990), quienes utilizaron PDA como medio y observaron micelio del mismo color en los aislamientos que estudiaron. Estos resultados sugieren que el color del micelio es una característica fenotípica de la especie que no permite distinguir entre los aislamientos estudiados.

4.2.3. Color de gemas

Las gemas presentaron el color amarillo intenso y fosforescente con algunas diferencias de intensidad en el brillo. De acuerdo a la escala de colores de Munsell se observó diferencias entre los aislamientos (Cuadro 2).

Los aislamientos de Sarchí (Sar- 6), Berlín (Ber-7) , Berlín (Ber-8), Chitaría (Chit-17), Chitaría (Chit-18), Paraíso (Par-9), Honduras (Hon-26), San Vito (SVit-25), Alto la Legua (ALeg-1), Platanal 1 (Plat-20) no produjeron gemas en el cultivo *in vitro* a los 20 días de la evaluación, por lo tanto no fueron incluidos en este análisis

Cuadro 2. Distribución del color de las gemas en 16 aislamientos de *M. citricolor*, de acuerdo la tabla de colores de Munsell (1977).CATIE, 2001.

Aislamientos	Valor Cromático	
	2.5Y	5Y
1) Par-10	8/6	
2) Pav-15	8/10	
3) SMig-4		8/8
4) Sar-5		8/8
5) Jim-16		8/8
6) Mir-19		8/8
7) CAT-12		8/10
8) CAT-13		8/10
9) Pav-14		8/10
10) Plat-21		8/10
11) Pej-22		8/10
12) Caj-23		8/10
13) Sped-24		8/10
14) Smarc-2		8/12
15) Ven-3		8/12
16) Camp-11		8/12

Los aislamientos de Paraíso (Par-10) y Pavones (Pav-15) presentaron valores cromáticos que se ajustan a la escala 2.5 Y : 8/6 y 8/10 respectivamente. Estos valores corresponden a un color amarillo de baja intensidad, ubicando estos aislamientos en valores cromáticos diferentes del resto de la población evaluada. Por el contrario la mayoría de los aislamientos se ubicaron dentro del rango de valores cromáticos que va desde 5Y (8/8 a 8/12), o sea presentaron un color amarillo más intenso. Estos últimos se agruparon de la siguiente manera: Los aislamientos San Miguel (SMig-4), Sarchí (Sar-5), Jiménez (Jim-16) y Miramar (Mir-19), se agrupan dentro del rango 5Y 8/8. Los aislamientos CATIE 1 (CAT-12), CATIE 2 (CAT13), Pavones (Pav-14), Platanal 2 (Plat-21), Pejibaye (Peji-22), Cajón (Caj-23), San Pedro (SPed-24) están dentro del rango 5Y 8/10, y finalmente San Marcos (SMarc-2), Venecia (Ven-3), Campabadal (Camp-11) se encuentran dentro del rango 5Y 8/12 (Cuadro 2).

Las diferencias en los valores cromáticos obtenidos en los aislamientos sugiere que la intensidad del pigmento amarillo de las gemas podría ser afectada por la calidad de luz, como lo indican estudios realizados por Snyder y Hansen (1956) citado por Romero (1988), quienes observaron diferencias marcadas en el color de las estructuras reproductivas de cepas de *Fusarium* spp sometidas a diferentes exposiciones de luz y oscuridad.

Rodríguez (1965), demostró que el máximo pigmento amarillo de *M. citricolor* se da cuando el hongo se expone a longitudes de onda de 310- 400 nm.. Por lo tanto, a pesar de que la intensidad de luz no fue evaluada, según estos resultados la luz es un factor que afecta el pigmento en dichas estructuras, produciendo que los aislamientos evaluados mantengan diferencias en la intensidad del pigmento amarillo de sus estructuras reproductivas.

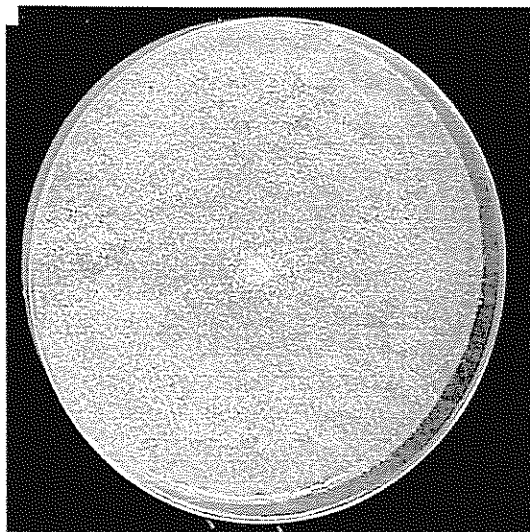


Figura.7. La fotografía muestra un cultivo del aislamiento de CATIE (Cat-13) cuyo color de las gemas corresponde al valor cromático 5Y(8/10), según la tabla de colores Munsell. CATIE, 2001.

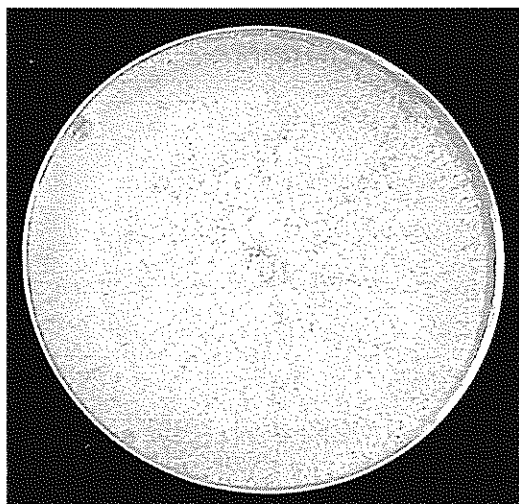


Figura 8. La fotografía muestra un cultivo del aislamiento de San Miguel (SMig-4) cuyo color de las gemas corresponden al valor cromático 5Y (8/8) , según la tabla de colores de Munsell.CATIE, 2001.

4.2.4. Patrón de crecimiento del micelio

Se observaron 6 diferentes patrones de crecimiento de las colonias. Por medio del crecimiento en forma de anillos, micelio ramificado, micelio estrellado y micelio granulado se pudo establecer diferencias entre los aislamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Patrón de crecimiento del micelio en 26 aislamientos de *M. citricolor*. Evaluado a los 10 días después de la inoculación. CATIE, 2001.

Aislamiento	Patrón de crecimiento
SMarc-2, Plat-21	micelio anillado, granulado y ramificado
ALeg-1, Ven-3, SMig-4, Ber-7, Ber-8, SVit-25	Micelio anillado con ramificaciones que se extienden desde el centro hasta el borde del plato
Sar-5, Sar-6, Pej-22	Micelio anillado y granulado
Camp-11, CAT-12, CAT-13, Pav-14, Pav-15, Jim-16, SPed-24	Micelio anillado con ramificaciones no continuas y crecimiento circular de gemas en el centro del micelio
Chit-17, Chit-18, Mir-19, Caj-23, Par-9, Par-10, Plat-20	Micelio anillado con ramificaciones en forma de estrella
Hon-26	Micelio anillado, ramificado y algodonoso

El análisis del patrón de crecimiento permitió establecer diferencias entre los aislamientos y ubicarlos en 6 grupos, (Cuadro 3). Sin embargo, la característica que se mantuvo constante en todos los aislamientos fue la presencia de anillos. Es importante mencionar que la presencia de anillos, aunque fue constante en los aislamientos varió en la cantidad de estos dentro de las repeticiones de cada aislamiento. Según este resultado sería muy difícil poder diferenciar aislamientos por medio de la cantidad de anillos.

Con excepción de los aislamientos Sarchí (Sar-5), Sarchí (Sar-6) y Pejibaye (Pej-22), Las diferentes ramificaciones del micelio es otra característica que estuvo presente en todos los aislamientos. Estas ramificaciones del micelio con el tiempo cambiaron, produciéndose micelios ramificados más gruesos, lo que pareciera indicar que el aumento en la cantidad de hifas en el micelio provoca diferencias morfológicas en los aislamientos.

El aislamiento procedente de Honduras (Hon-26) presentó una característica diferente del resto de los aislamientos, su apariencia fue algodonosa. Esta característica se mantuvo constante durante toda la evaluación, incluso hasta los 30 días después de la inoculación (Figura 9). La apariencia algodonosa observada en este aislamiento podría estar relacionada con su procedencia si se considera que este aislamiento es el más distante geográficamente, debido a las condiciones en que se ha desarrollado podría haber generado un patrón de crecimiento totalmente diferente a los obtenidos en Costa Rica.

Los aislamientos que proceden de un mismo sitio: Berlín (Ber-7) y Berlín (Ber-8), Sarchí (Sar-5) y Sarchí (Sar-6), Pavones (Pav-14) y Pavones (Pav-15), Chitaría (Chit-17) y Chitaría (Chit-18), Paraíso (Par-9) y Paraíso (Par-10), no presentan diferencias fenotípicas en su patrón de crecimiento con su aislamiento más cercano. Por lo tanto, las condiciones climáticas en un sitio geográfico muy cercano ha permitido el desarrollo de un patrón de crecimiento similar (Cuadro 3).

Los aislamientos de Campabadal (Camp-11), CATIE 1 (CAT-12), CATIE 2 (CAT-13), Pavones (Pav-14), Pavones (Pav-15), Jiménez (Jim-16), San Pedro (SPed-24), presentan un patrón de crecimiento de micelio anillado con ramificaciones no continuas y crecimiento circular de gemas en el centro del micelio. Esto indica que su apariencia también podría estar relacionada con el lugar de origen, ya que todos estos aislamientos proceden de la zona de Turrialba. Esto sugiere una relación entre el patrón de crecimiento y su adaptación y distribución en dicha zona. Es importante señalar que estos aislamientos también fueron los primeros en producir gemas en medio de cultivo.

Como última observación, 16 aislamientos después de 20 días de haber sido inoculados en el sustrato, habían producido gemas en gran cantidad, esto provocó que el patrón de crecimiento del micelio fuera difícil de diferenciar. A los 30 días de crecimiento todos los aislamientos con excepción del aislamiento de Honduras (H26) presentaron patrones distintos al patrón original, debido a la masa de gemas presentes en el sustrato, solamente se podían diferenciar los anillos y ninguna otra característica fenotípica relacionada con la apariencia. Por lo tanto, los resultados para diferenciar por medio del patrón de crecimiento, solo se aplica en los aislamientos hasta los 10 días.

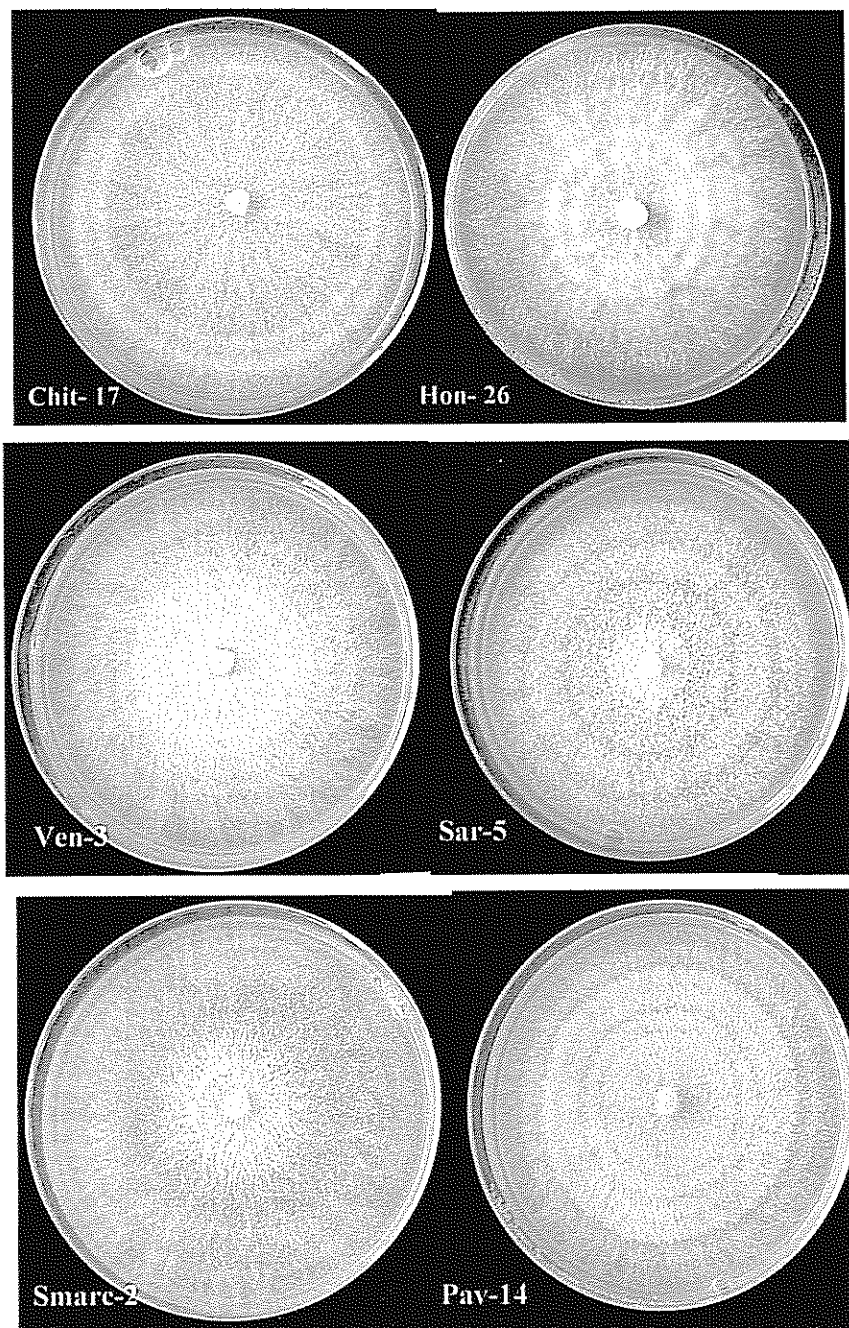


Figura.9. Fotografías que presentan los 6 patrones de crecimiento observados en los 26 aislamientos de *M. citricolor*. 1) Chitaría 17 (Chit-17) con micelio anillado, con ramificaciones en forma de estrella 2) Honduras (Hon-26) con micelio anillado ramificado y algodonoso. 3) Venecia (Ven-3) con micelio anillado con ramificaciones que se extienden desde el centro hasta el borde del plato. 4) Sarchí (Sar-5) con micelio anillado y granuloso. 5) San Marcos (SMarc -2) con micelio anillado, granuloso y ramificado. 6) Pavones (Pav-14) con micelio anillado con ramificaciones no continuas y crecimiento circular de gemas en el centro del micelio.

4.3. Estudio molecular

4.3.1. Medio de cultivo mineral

El medio de cultivo mineral fue fácil de implementar durante la investigación, permitió producir suficiente micelio a partir de las gemas a los 7 días después de la inoculación para la extracción de ADN para la determinación de ADN. Además, la apariencia del medio líquido fue de color amarillo transparente, el cual permitió identificar los cultivos contaminados por bacteria, previo a la extracción de ADN.

El micelio obtenido en el medio mineral a partir de gemas infectivas presentaban una coloración blanca de forma esférica. Se produjeron masas globoideas de 1 a 4 cm de diámetro a los 7 días (Figura.10). El secado del micelio fue rápido y se obtuvo suficiente cantidad para el análisis de ADN. Sin embargo, se observó que algunos aislamientos luego de pasar por la etapa de secado no quedaron completamente deshidratados para poder ser pulverizados, presentaban un aspecto “gomoso” lo cual dificultó la extracción y purificación del ADN.

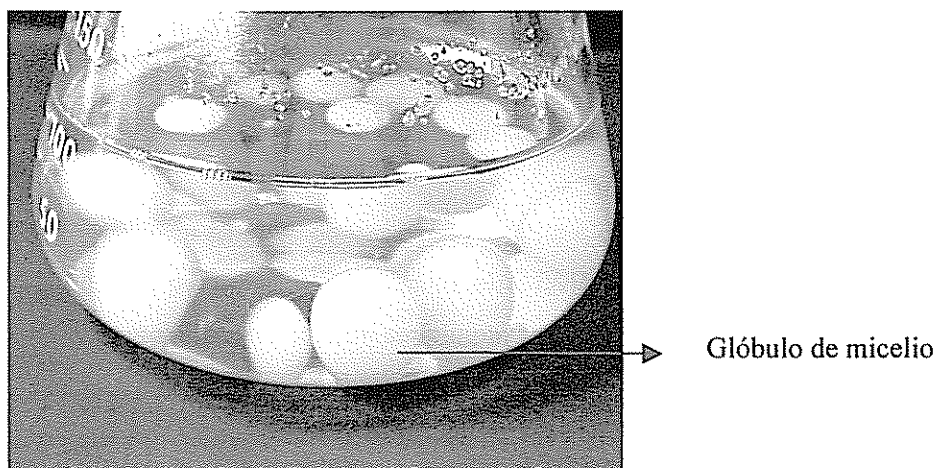


Figura. 10. Glóbulos de micelio producido en el medio mineral a partir de gemas de *M. citricolor*, a los 7 días de incubación (23°C). CATIE, 2001.

A pesar de no haber realizado un conteo de la cantidad de gemas en el medio mineral, se realizó un análisis de varianza al rendimiento del micelio encontrándose diferencias significativas entre los aislamientos, (Anexo 14). Los aislamientos con los mayores promedios de rendimiento de micelio fueron Pejibaye (Pej-22) y Cajón (Caj-23), con 0,7750 g cada uno. Por el contrario, el aislamiento con el menor promedio fue Pavones (P-14) con 0,1000 g (Cuadro 4).

Cuadro 4. Producción de micelio seco de 26 aislamientos de *M. citricolor*. CATIE, 2001.

Aislamiento	Rendimiento promedio (g)	Aislamiento	Rendimiento promedio (g)
Aleg-1	0,2300	Pav-14	0,1000
Smarc-2	0,2150	Pav-15	0,4650
Ven-3	0,4700	Jim-16	0,2800
Smig-4	0,4600	Chit-17	0,5250
Sar-5	0,2850	Chit-18	0,3050
Sar-6	0,2150	Mir-19	0,4050
Ber-7	0,6800	Plat-20	0,4100
Ber-8	0,3850	Plat-21	0,2600
Par-9	0,2000	Pej-22	0,7750
Par-10	0,7550	Caj-23	0,7750
Camp-11	0,3200	SPed-24	0,4550
CAT-12	0,1850	SVit-25	0,3850
CAT-13	0,3250	Hon-26	0,2750

4.3.2. Aislamiento y determinación de la concentración de ADN

Se probó 3 métodos: CATB, Wisconsin modificado y el MATAB, este último fue el más adecuado para lograr la mayor cantidad y pureza de ADN. Tanto el CTAB y Wisconsin modificado presentaron niveles de contaminantes que no pudieron ser eliminados y afectaban la cuantificación del ADN. Estos contaminantes eran, ARN, carbohidratos y proteínas que estaban adheridas al ADN. Por lo general los hongos están constituidos por carbohidratos y proteínas, para *M. citricolor* pareciera no ser la excepción, debido a que todos los aislamientos presentaron grandes cantidades de estos compuestos (Romero 1988).

Otra ventaja del método MATAB es que a partir de 20 mg de micelio por muestra se pudo extraer y cuantificar el ADN. Además, es importante señalar que esta metodología no necesita de grandes cantidades de micelio y una vez conocida resulta fácil de manejar (Anexo 3).

Los valores de rendimiento del ADN se presentan en el cuadro 5. Los rendimientos variaron entre 30 ng/ μ l y 150 ng/ μ l. Ferreira y Grattapaglia (1998), menciona que existe un amplio rango de concentración de ADN que permite realizar "RAPD" con éxito, en general se recomienda de 2 a 20 ng por reacción. Partiendo de esta información, el método MATAB fue capaz de producir los rendimientos necesarios de ADN para realizar estudios en *M. citricolor*.

Cuadro 5. Rendimiento de ADN extraído con el método MATAB. A partir de los 26 aislamientos de *M. citricolor* estudiados. CATIE, 2001.

Código	Rendimiento (ng)	Código	Rendimiento (ng)
ALeg-1	90	Pav-14	80
SMarc-2	80	Pav-15	90
Ven-3	100	Jim-16	100
SMig-4	150	Chit-17	40
Sar-5	100	Chit-18	100
Sar-6	150	Mir-19	100
Ber-7	110	Plat-20	80
Ber-8	130	Plat-21	120
Par-9	85	Pej-22	90
Par-10	90	Caj-23	140
Camp-11	80	SPed-24	90
CAT-12	90	SVit-25	90
CAT-13	85	Hon-26	30

4.3.3. Amplificación del ADN

Se realizaron pruebas para seleccionar y optimizar la concentración de los "primers". Finalmente la concentración utilizada fue de 0.8 μ M, la cual produjo la mejor visualización de las bandas de ADN. Anteriormente estas mismas secuencias de "primers" habían sido utilizados para trabajos realizados en café en el laboratorio de biología molecular del CATIE, los cuales presentaron buenas amplificaciones a la concentración antes mencionada.

4.3.4. Análisis de los polimorfismos revelados.

Los “primers” descartados fueron todos aquellos que después de haber hecho amplificaciones con los 5 genotipos de *M. citricolor* seleccionados no presentaron polimorfismos claros y las bandas no eran definidas. Las bandas que se presentaron en los extremos y que eran muy débiles y difíciles de interpretar, no fueron tomadas en cuenta porque podían ser un factor de error a la hora de leer los fragmentos.

Se obtuvieron 81 bandas polimórficas generadas a partir de los 17 “primers” seleccionados (Cuadro 6). Se presentaron variaciones en el número de bandas polimórficas, el “primer” que presentó menor número de bandas polimórficas fue el OPD18 con 3 y el de mayor bandas polimórficas fue el OPL18 con 8 bandas. El número de bandas polimórficas encontrados en estos “primers” demuestran su efectividad para encontrar diferencias entre los aislamientos estudiados (Cuadro 6).

Cuadro 6. Secuencia, número y tamaño de bandas para cada uno de los “primers” polimórficos utilizados. CATIE, 2001.

Primer	Secuencia 5' a 3'	Número de bandas polimórficas	Tamaño de bandas polimórficas Rango (Pb)
UBC13	CCT GGG TGG A	5	>1500,>1500,800,(700-600), 700
UBC28	CCG GCC TTA A	4	1250, (1000-900),800, (600-500)
UBC202	GAG CAC TT A	5	>1500,(1500-1250), (900-800), (800-700), 600
UBC220	GTC GAT.GTC	4	1500, 1250, 900, (800-700)
UBC268	AGG CCG CTT	4	1250,(900-800), (800-700), 700
UBC299	TGT CAG CGG T	4	>1500,(1500-1250), (900-800), 700
UBC272	AGC GGG CCA	5	(1500-1250),1250, 900, (800-700), (600-500)
UBC275	CCG GGC AAG C	4	(1500-1250),(1250-1000), (1000-900), (900-800)
UBC300	GGC TAG GGG G	5	(1250-1000),(1000-900), 900, 700, 600
OPA13	CAGCACCCAC	5	(1500-1250),(1250), (1250-1000),(900-800), 700
OPB20	GGACCCTTAC	4	>1500, (1250-1000), 1000, (800-700)
OPC13	AAGCCTCGTC	4	>1500,>1500, (1500-1250), (900-800)
OPC18	TGAGTGGGTG	6	>1500,1500, (1500-1250), 1000, 900, 800
OPD18	GAGAGCCAAC	3	600, (600-500), (500-400)
OPE11	AACGCGTCGG	7	1500,(1500-1250), 1250, (1000 -900),700,600, 500
OPJ19	GGACACCACT	4	>1500,>1500,1500, 1250
OPL18	ACCACCCACC	8	>1500,>1500, 1500, (1250-1000), 1000, 800, 700, 400
Total		81	

4.3.6. Matriz de distancia y Dendograma.

La Figura 12 muestra el dendograma generado en este estudio. Se observa que los genotipos estudiados de *M. citricolor* se encuentran dentro de un rango de distancia genética de 0,15 a 0,80 (Anexo 15). Los aislamientos que presentaron las distancias genéticas más similares fueron los genotipos Alto la Legua (ALeg-1) con San Marcos (SMarc-2), Venecia (Ven-3) con San Miguel (SMig-4), Sarchí (Sar-5) con Sarchí (Sar-6), Berlín (Ber-7) con Berlín (Ber-8), Paraíso (Par-9) con Paraíso (Par-10), CATIE 1 (CAT-12) con CATIE 2 (CAT-13), Pavones (Pav-14) con Pavones (Pav-15), Pejibaye (Pej-22) con Cajón (Caj-23) y Chitaría (Chit-17) con Chitaría (Chit-18). Los aislamientos más distantes fueron Jiménez (Jim-16) con Venecia (Ven-3) (Anexo 15).

El dendograma identificó **4 grupos** formados a partir de los 26 aislamientos de *M. citricolor* acorde al coeficiente de Jaccard:

- a) **El grupo 1** formado por Venecia (Ven-3), San Miguel (SMig-4), Paraíso (Par-9), Paraíso (Par-10), San vito (SVit-25) y Honduras (Hon-26).
- b) **El grupo 2** está integrado por Miramar (Mir-19), Chitaría (Chit-17), Chitaría (Chit-18) y Jiménez (Jim-16).
- c) **El grupo 3** lo integran los genotipos de Platanal 1 (Plat-20), Platanal 2 (Plat-21), Pejibaye (Pej-22), Cajón (Caj-23) y San Pedro (SPed-24).
- d) Finalmente **el grupo 4** está formado por Berlín (Ber-7), Berlín (Ber-8), Sarchí (Sar-5), Sarchí (Sar-6), CATIE (CAT-12), CATIE (CAT-13), Pavones (Pav-14), Pavones (Pav-15), Campabadal (Camp-11), San Marcos (SMarc-2), Alto la legua (ALeg-1), Este a su vez puede ser subdividido en 3 sub grupos:
 - **El subgrupo 4A** formado por Berlín (Ber-7), Berlín (Ber-8), Sarchí (Sar-5), Sarchí (Sar-6).
 - **El subgrupo 4B** integrado por CATIE (CAT-12), CATIE (CAT-13), Pavones (Pav-14) y Pavones (Pav-15), campabadal (Camp-11).
 - **El subgrupo 4C** formado por los aislamientos de Alto la Legua (ALeg-1) y San Marcos (SMarc-2).

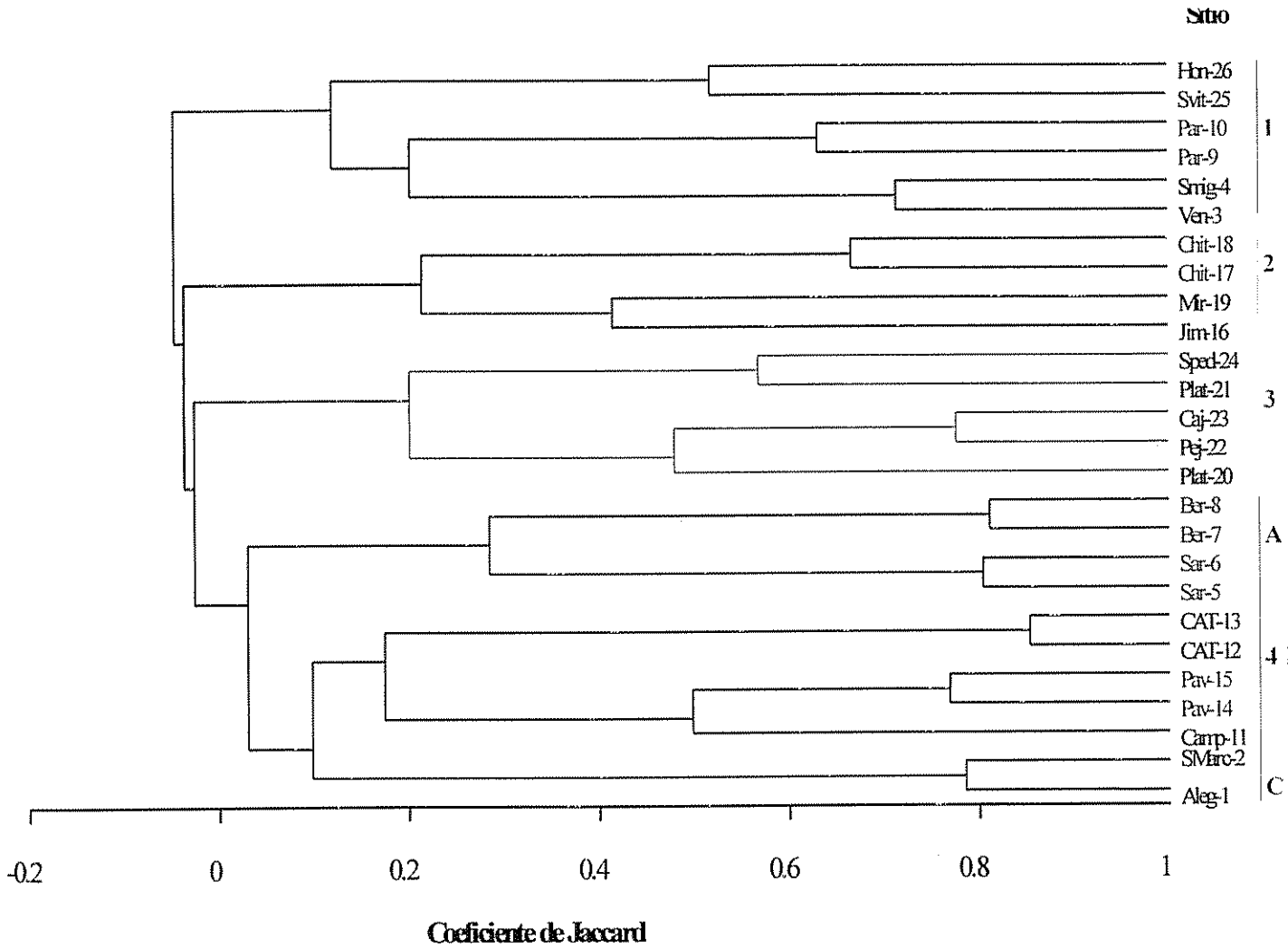


Figura 12. Dendrograma generado a partir de 26 aislamientos de *M. citricolor*. Basado en el índice de Jaccard. CATIE, 2001.

Se puede observar que los aislamientos que proceden del mismo sitio presentaron las menores distancias genéticas (Figura 12/ anexo 15), estos son los aislamientos de Chitaría (Chi-17) y (Chi-18) ubicados en el grupo 2, Paraíso (Par-9) y (Par-10) ubicados en el grupo 1, Pavones (Pav-14) y (Pav-15) grupo 4 (subgrupo B), Berlín (Ber-7, Ber-8) y Sarchí (Sar-5, Sar-6) grupo 4 (subgrupo A). A pesar de un número limitado de muestreo el resultado parece indicar que los aislamientos procedentes de un mismo sitio de muestreo presentan una relación genética muy estrecha.

El **grupo 1** presentó el porcentaje mayor de disimilaridad con respecto a los otros grupos (Figura 12). Dentro de este grupo se ubicaron los aislamientos de Paraíso (Par-9 y Par 10), como se mencionó antes mantienen una estrecha similitud entre sí del 63% (Anexo 15) debido a que son materiales que provienen de un mismo sitio. También se agrupan, los genotipos de Venecia (Ven-3) y San Miguel (SMig-4) que mantienen una similitud entre ellos del 71% (Anexo 15), esto se puede explicar si se considera que estos sitios están poco distanciados y además las barreras geográficas entre ellos son prácticamente inexistente. También, son comunidades que se encuentran unidas por una carretera principal a una distancia de tan solo 30 minutos. Estos resultados sugieren que el patógeno en estos sitios ha tenido mucha oportunidad de movimiento, así como condiciones ambientales similares que les permiten mantener una estrecha similitud.

Sin embargo, en este mismo grupo (1) se ubicó el aislamiento de Honduras (Hon-26), el cual fue incluido en este trabajo con el fin de ver su relación con respecto a los aislamientos de Costa Rica. Los resultados presentaron una similitud del 52% (Anexo 15) con el aislamiento San Vito de Coto Brus (SVit-25). Al observar el dendograma se confirma que estos aislamientos fueron agrupados juntos y mantienen una diferencia geográfica muy grande. Si analizamos las barreras geográficas de los lugares de origen pareciera no ser lógico encontrar individuos tan similares entre sí, pero, es importante recordar que en el estudio solamente se utilizó un solo aislamiento de Honduras comparado contra 25 de Costa Rica.

Es importante recordar que *M. citricolor* al tener un origen americano como lo indica Maublanc y Rangel (1914), es un patógeno nativo que ataca aproximadamente 550 especies, incluyendo especies forestales. Es posible una distribución del hongo a lo largo de Mesoamérica con condiciones similares ha permitido al patógeno colonizar sitios similares en su expansión natural. En un futuro es necesario contar con más muestras para establecer claramente la relación genética de genotipos de Honduras con los genotipos de Costa Rica.

El grupo 2 integrado por los aislamientos de Miramar (Mir-19), Chitarfa (Chi-17) y (Chi-18) y Pejibaye (Pej-16). Estos tres últimos pertenecientes a la zona de Turrialba. Podemos notar que el aislamiento de Miramar (Mir-19) mantiene más de un 50 % de similitud con los aislamientos de Turrialba (Anexo 15), lo que sugiere que fue llevado de un sitio a otro por el movimiento de café que se ha dado de una zona a otra durante el último siglo. Además, se debe considerar que la zona de Turrialba ha sido durante muchos años un centro de distribución de café para otras zonas del país. También, Costa Rica es un país con una extensión geográfica pequeña, donde durante muchos años su principal cultivo agrícola ha sido el café. Aunque al principio se ubicó en el valle central, posteriormente se ha expandido por todo el territorio nacional. Carvajal (1939), menciona que es posible llevar la enfermedad de un lugar a otro por medio de hojas, frutos que al desprenderse y pasar por otros tejidos sanos los contamina; por el viento, y por introducción de almácigo enfermo, por animales, pájaros, murciélagos y especialmente por insectos (Figura 12).

El grupo 3 todos los aislamientos que lo integran provienen de la zona de Pérez Zeledón y forman un grupo muy homogéneo, que geográficamente están estrechamente relacionados. La zona de Pérez Zeledón presenta características especiales, está rodeada por montañas. Separada del Valle Central por el Cerro de la Muerte, una hilera de montañas que sobrepasan los 3000 msm, que es una barrera geográfica muy importante. Estas condiciones posiblemente han permitido que el patógeno desarrolle ciertas características propias. Estos supuestos podrán ser confirmados solamente realizando estudios específicos con mayores genotipos de esta zona del país (Figura 12).

El grupo 4 reúne la mayor cantidad de genotipos y presenta el menor porcentaje de disimilaridad con respecto a los grupos 1, 2 y 3. En este grupo se observa una clara tendencia a subagruparse de acuerdo a su zona geográfica más cercana. Además, se puede observar que los subgrupos 4 A y 4 B están formados por genotipos muy similares, como se discutió anteriormente. Para el caso del subgrupo 4 C, los genotipos no guardan cercanía geográfica entre ellos, aunque están dentro del valle central con condiciones ambientales similares, que posiblemente les ha permitido desarrollar características genéticas similares (Figura 12).

4.3.7. Prueba de X^2

Se realizó una prueba de X^2 a cada una de las 81 bandas polimórficas obtenidas en el presente trabajo, con el fin de reconocer cuales eran las bandas con mayor aporte significativo a la formación de los grupos. Estos fueron OPA13 (1250-1000 pb), OPC18 (1500 pb), UBC272 (1500-1250 pb),

UBC272 (600-500pb), OPJ19 (1500 pb), UBC220 (800-700 pb), UBC299 (>1500 pb), UBC275 (1250-1000pb), UBC275 (900-800pb), OPL18 (>1500pb), OPL18 (1500pb), UBC268 (1250 pb), OPB20 (1000 pb), UBC28 (1250 pb), donde la probabilidad de X^2 fue menor que 0.1. Por lo tanto, estas bandas se consideran de mayor relevancia para discriminar entre grupos y por lo tanto para caracterizar los aislamientos de *M. citricolor*.

4.4. Comparación de la variabilidad detectada a partir de caracteres morfológicos y marcadores moleculares.

La variable cualitativa de color de micelio no aportó ningún valor para diferenciar los aislamientos. Por el contrario, las variables cuantitativas, el color de las gemas y el patrón de crecimiento del micelio sugiere que podría existir algún grado de variabilidad genética entre los 26 aislamientos. De estos resultados se puede deducir que no es posible relacionar de forma descriptiva toda la variabilidad generada por las variables cuantitativas (diámetro de la colonia, longitud de pedicelo, diámetro de gema), variables cualitativas (color de gemas y patrón de crecimiento) de los 26 aislamientos estudiados con los resultados moleculares, aunque se aprecia que existe relación entre algunos de los aislamientos estudiados.

4.4.1. Variables cuantitativas.

Al comparar los resultados de las variables morfológicas cuantitativas y los resultados moleculares, se observó que los aislamientos provenientes de un mismo sitio, Berlín (Ber-7 y Ber-8), Pavones (Pav-14 y Pav-15) fueron agrupados tanto por resultados morfológicos como moleculares. (Figura 5 y 12). También, se puede comparar el agrupamiento de los aislamientos de Berlín (Ber-7 y Ber-8) con el aislamiento de Sarchí (Sar-6), agrupándose tanto por las variables cuantitativas como moleculares (Figura 5 y 12).

Los aislamientos de Turrialba, CATIE (CAT-12 y CAT-13) con Campabadal (Camp-11) se agruparon en el grupo 1 del fenograma (Figura 5) de la misma forma el análisis molecular agrupó a estos aislamientos en el grupo 4 B (Figura 12), el mismo resultado se sugiere para los aislamientos de Honduras (Hon-26), San Vito (SVit-25). Es importante mencionar que a los aislamientos de Pérez Zeledón, Cajón (Caj-23), Pejibaye (Pej-22) y Platanal (Plat-21) mantienen una estrecha similitud tanto por los resultados moleculares como por las variables cuantitativas morfológicas, esto confirma que la zona de Pérez Zeledón por su ubicación geográfica podría facilitar el desarrollo de

ciertas características que permiten que estos aislamientos mantengan una estrecha similitud genética .

4.4.2. Color de las gemas.

Los caracteres morfológicos de color de gemas agrupó a los aislamientos de la zona de Turrialba CATIE (CAT 12 y 13), Pavones (Pav-14), y a los aislamientos de Platanal (Plat-21), Pejibaye (Pej-22), Cajón (Caj-23) y San Pedro (SPed-24) de la zona Pérez Zeledón dentro de un mismo valor cromático (5Y 8/10). Mientras que al comparar estos resultados con los obtenidos por medio de los marcadores moleculares se aprecia que el análisis molecular separó a los aislamientos que provenían de Turrialba de los aislamientos de Pérez Zeledón.

La distancia genética entre los aislamientos de Turrialba fueron relativamente pequeñas, CATIE (CAT 12 y 13) mantuvieron una distancia genética aproximadamente del 15% (Anexo 15). Al comparar este resultado con el valor cromático de estos aislamientos se aprecia que mantienen el mismo valor cromático, 5Y (8/10). Además, el aislamiento Pavones (Pav-14) presentó una distancia genética del 37% respecto a CAT-12 y 34 % respecto a CAT-13 (Anexo 15), todos con el mismo valor cromático, 5Y(8/10).

Los aislamientos de Platanal 2 (Plat-21), Pejibaye (Pej-22), Cajón (Caj-23), San Pedro (SPed-24) todos pertenecientes a la zona de Pérez Zeledón también fueron agrupados juntos tanto por medio de los valores cromáticos como por los resultados moleculares. Sin embargo, los valores cromáticos agruparon a los aislamientos de Turrialba y Pérez Zeledón juntos, mientras que el análisis molecular, agrupó a las dos zonas por separado. Esto indica que no existe una relación clara entre el genotipo y el carácter morfológico de color en estos aislamientos

4.4.3. Patrón de crecimiento del micelio *in vitro*

El patrón de crecimiento del micelio es la característica que mayor aportó para ser comparada con el análisis molecular. Los genotipos, Sarchí (Sar-5) y (Sar-6), Berlín (Ber-7) y (Ber-8), Paraíso (Par-9) y (Par-10), CATIE (CAT-12) y (CAT-13), Pavones (Pav-14) y (Pav-15), Chitaria (Chi-17) y (Chi-18), presentaron un patrón de crecimiento similar entre sí, de la misma forma la caracterización molecular también detectó que estos aislamientos tienen mucha similitud genética.

Al observar el dendograma (Figura 12) se aprecia que los aislamientos Alto la legua (Aleg-1) y Berlín (Ber-7) y Berlín (Ber-8) se agruparon en el grupo 4 con un patrón de crecimiento: micelio anillado con ramificaciones que se extienden desde el centro hasta el borde del plato. En el grupo 4B están presentes los aislamientos Campabadal (Camp-11), Catie (Cat-12), Catie (Cat-13), Pavones (Pav-14), Pavones (Pav-15) de la misma forma se agruparon con un mismo patrón de crecimiento: micelio anillado con ramificaciones no continuas y crecimiento circular de gemas en el centro del micelio. Los aislamientos de Miramar 19 (Mir-19), Chitaría (Chit-17), Chitaría (Chit-18) se ubicaron el grupo 2, presentando el mismo patrón de crecimiento. Por lo tanto, este resultado sugiere que el patrón de apariencia de estos aislamientos podría estar relacionada con la diversidad genética reportada por los marcadores moleculares. Por último, los genotipos Venecia (Ven-3) y San Miguel (SMig-4), Platanal 1 (Plat-20) y Cajón (Caj-23), presentaron patrones de crecimiento del micelio que también se relacionan con los obtenidos por el análisis molecular.

4.5. Comparación entre variables climáticas por medio de los Sistemas de Información Geográfica y la diversidad genética detectada por los marcadores moleculares.

Como se ha dicho anteriormente la tendencia de los resultados obtenidos del análisis molecular es agrupar los aislamientos según su procedencia. El mapa 1 (Anexo 16), señalan los puntos de localización geográfica de cada uno de los sitios de muestreo que fueron incluidos en el presente trabajo.

4.5.1 Brillo solar

En el mapa 2 de brillo solar (Anexo 16), se pueden observar que los grupos genéticos están asociados con la variable de brillo solar. Las muestras provenientes de Pérez Zeledón (grupo 3) se ubican en una región donde el brillo solar presentó valores desde 4 hasta 5 horas de brillo solar/día. En general es el grupo más característico porque comparten una alta relación genética y condiciones meteorológicas de brillo solar.

Las muestras del grupo 4 A (Berlín y Sarchí) son también muy particulares y también se asocian a una región de alto brillo solar. Las muestras provenientes de Turrialba grupo 4 B y el grupo 2 se ubican en una misma área, a excepción de Miramar que se encuentra alejada de dicha zona. En esta área, la variabilidad genética es mayor con el número de grupos genéticos.

Al observar el mapa 2 (Anexo 16) en el área con horas de brillo solar de 3 a 4 horas/día se ubican un total de 3 grupos genéticos diferentes. Esto sugiere que debido a la falta de brillo solar y por consiguiente buenas condiciones para el desarrollo de la enfermedad, esta zona permite que una mayor cantidad de individuos con diferentes características genéticas puedan desarrollarse sin mayor problema.

4.5.2. Evapotranspiración

Para el caso de la evapotranspiración potencial (Anexo 16/ Mapa 3) la relación entre la variabilidad genética y esta variable no es clara, porque ningún grupo coincidió con el rango de evapotranspiración.

4.5.3. Precipitación pluvial.

Tanto el café como el hongo comparten las mismas necesidades agroclimáticas para su desarrollo. (ICAFE, 1989; Quan, 1999) y en el caso particular de este trabajo, puede verse en el mapa 4 (Anexo 16), que las áreas donde se siembra café son las más apropiadas para el desarrollo de la enfermedad (Mapa 6 /Anexo 16). Para el caso de la precipitación, se observa que una precipitación mayor de 1,400 mm por año es suficiente para permitir el desarrollo de *M. citricolor*.

El grupo 4 C, los aislamientos de Alto la legua (Aleg-1) y San Marcos (Smar-2) si bien no fueron obtenidos de áreas cercanas (Mapa 1/Anexo 16) comparten niveles de precipitación similares, lo cual puede explicar que aunque geográficamente distantes presentan similitud genética (21 %), posiblemente debido a estas condiciones meteorológicas similares.

4.5.4. Temperatura.

Para el caso de temperatura (Mapa 5/Anexo 16), el hongo no muestra diferencias en su desarrollo si se mantiene el rango necesario para su desarrollo (Quan, 1999). En consecuencia esta variable no ejerce mucha presión de selección y permite el desarrollo de la enfermedad sin mayor complicación. Atención especial requiere el grupo de Pérez Zeledón (grupo genético 3). En función de temperatura es el único grupo que comparte condiciones de temperatura similares, de igual forma el grupo 4 B.

En el (Mapa 6/Anexo 16) se presenta un resumen de áreas propicias para el desarrollo de *M. citricolor*. Las zonas de Turrialba, Heredia y San Marcos de Tarrazú son propicias para el desarrollo de la enfermedad. En general el grupo 3 y el grupo 4 A se ubican en zonas que según los requerimientos del hongo, no son propicias para su desarrollo, en cuanto a precipitación, brillo solar y temperatura. Es importante señalar que si bien no son zonas óptimas para su desarrollo, parece ser que el hongo ha logrado adaptarse a estas nuevas zonas y desarrollarse sin ningún problema.

Es importante resaltar que el grupo 1, 2 y subgrupo 4C, no parece tener una explicación clara, porque los aislamientos de un mismo grupo genético no comparten condiciones de desarrollo similares. En general la variabilidad de *M. citricolor* en estudio, proporciona una idea de su relación con las variables metereológicas estudiadas, indicando que las condiciones metereológicas podrían ejercer un papel importante en el comportamiento de los aislamientos que fueron estudiados.

5. CONCLUSIONES

- La variable cuantitativa diámetro de la colonia evaluada para diferenciar fenotípicamente los 26 aislamientos de *M. citricolor* presentó diferencias significativas.
- El patrón de crecimiento del micelio fue la variable morfológica de mayor aporte para la diferenciación entre los aislamientos.
- El aislamiento H-26 procedente de Honduras presentó un patrón de crecimiento distinto al resto de los aislamientos de Costa Rica. Por el contrario, el análisis molecular no detectó diferencias entre este aislamiento y los aislamientos de Costa Rica.
- A pesar que algunos de los aislamientos evaluados presentaron caracteres morfológicos que coinciden con los resultados obtenidos del análisis molecular, no es posible concluir que por las características morfológicas se podría diferenciar la diversidad encontrada por los marcadores moleculares.
- La metodología empleada en el cultivo de las gemas de *M. citricolor* en medio mineral permitió producir micelio seco en la calidad y cantidad suficiente para realizar el estudio.
- La distancia genética detectadas entre aislamientos que proceden de un mismo sitio, sugieren que el grado de similitud entre estos aislamientos es muy alta.
- La metodología de extracción de ADN "MATAB" permitió obtener ADN de *M. citricolor* en la cantidad y calidad necesaria para el análisis molecular.
- La técnica RAPD permitió encontrar los polimorfismos necesarios para detectar la diversidad genética en 26 aislamientos de *M. citricolor*.

- De las 81 bandas polimórficas generadas se pudo identificar las bandas con el mayor aporte para la agrupación y caracterización de los aislamientos. Estas bandas son: OPA13 (1250-1000 pb), OPC18 (1500 pb), UBC272 (1500-1250 pb), UBC272 (600-500pb), OPJ19 (1500 pb), UBC220 (800-700 pb), UBC299 (>1500 pb), UBC275 (1250-1000pb), UBC275 (900-800pb), OPL18 (>1500pb), OPL18 (1500pb), UBC268 (1250 pb), OPB20 (1000 pb), UBC28 (1250 pb).
- El índice de similitud de Jaccard y el método de Ward permitió agrupar a los aislamientos de acuerdo a la matriz de distancia genética. Se formaron 4 grupos, los cuales mantienen una estrecha relación con sus procedencias geográficas, a excepción de los aislamientos de Miramar, Las Vegas y San Vito, los resultados parecen indicar que entre menor sea la distancia geográfica menor será la distancia genética.
- El patrón de crecimiento del micelio fue el carácter morfológico que más aportó para relacionarse con la agrupación de genotipos respecto al análisis molecular.
- La variable metereológica que presentó mayor relación con la variabilidad del hongo reflejada en el análisis de ADN fue el brillo solar.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para futuras investigaciones con *M. citricolor* se inicie el muestreo para obtener los aislamientos durante el mayor pico de infección y mayor actividad del inóculo, es decir los meses de septiembre a octubre. El muestreo en el presente trabajo se realizó en la época de niveles mas bajos, dificultando el desarrollo de gemas en cámara húmeda.
- Es necesario realizar estudios similares con un mayor número de aislamientos por sitio geográfico y durante varios años consecutivos para obtener una mayor precisión de la diversidad genética del hongo. Además, sería importante incluir aislamientos que procedan de otros países para conocer mejor el grado de diversidad genética que ha alcanzado *M. citricolor*.
- Se recomienda también, extender el análisis a otros hospederos del patógeno, para determinar si hay especificidad de razas en café.
- Se recomienda hacer una caracterización de los sitios de mayor incidencia y severidad de este patógeno tomando en cuenta variables metereológicas medidas en el sitio, para lograr una relación real de esta condición y la variabilidad del patógeno.
- En el futuro se debe estudiar más el ciclo del patógeno y en sucesivos análisis de caracterización molecular se incluya aislamientos de la fase sexual, para conocer su relación con la variabilidad de la fase asexual.

7. LITERATURA CONSULTADA

- Alexopoulos, C.J. 1962. Introductory mycology. 2 ed. Estados Unidos de América. 613 p.
- Arroyo H, T. 1975. Control biológico del ojo de gallo en el café causado por *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc. en época seca. Tesis Ing Agr. San José, C.R. Universidad de Costa Rica. 65 p.
- Arus, P; Cubero, JI; García M, J; Rallo, L. Marcadores Moleculares en Genética y Mejora de plantas. 39 p.
- Astorga D, C G. 1999. Caracterización de variedades cultivadas de café (*Coffea arabica* L.) conservadas en el banco de germoplasma del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 130 p.
- Avelino, J; Toledo, JC; Medina, B. 1995. Desarrollo del ojo de gallo *Mycena citricolor* en una finca del norte de Guatemala y evaluación de los daños provocados por esta enfermedad. Simposio de la Caficultura Latinoamericana, IICA, Costa Rica. sp.
- Barret, E C; Curtis, L F. 1992. Introduction to environment remote sensing. Chapman & Hall. Londres. 3 edición. 426 p.
- Bonilla, JC. 1980 Estudio del ojo de gallo causado por el hongo *Mycena citricolor*. In Simposio Latinoamericano sobre Caficultura (3º, 1980, Tegucigalpa, Honduras) Trabajos, Tegucigalpa, IICA, PROMECAFE. P. 177-188 (IICA: Serie ponencias, resultados y recomendaciones de eventos técnicos no. 263).
- Brock, T; Madigan, M T; Martinko, J M; Parker, J. 1994. Biology of microorganisms. New Jersey, Prentice.
- Caetano-Anollis, G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. In PCR Methods and applications. Cold Spring Harbor Laboratory. p. 85-94.

- Carbonell, C; Cifuentes, D; Tello, J; Cenis, J.L. 1994. Boletín de Sanidad Vegetal. (Plagas) 20(4): 919-926.
- Carlson, J.; Tulsieram, J.; Glaubitz, J.; Luk, V.W.K.; Kaufelt, C.; Rutledge, R. 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. Theoretical and Applied Genetics. 83: 194-200.
- Carvajal, B.F. 1939. Ojo de gallo *Omphalia flavida*. Revista del Instituto de Defensa Café (Costa Rica) 7: 535-576
- Cornide, MT. 1998. Uso de los marcadores moleculares en la genética y la selección de las plantas, CNIC, La Habana, Cuba. 86 p.
- Curling C, F. 1986. Combate biológico del ojo de gallo *Mycena citricolor* (Berk & Curt) sacc. por medio de *Trichoderma harzianum* Rifai, en el cafeto. Tesis Lic. Ing. Agr. San José, Universidad de Costa Rica. 48 p
- Clay, K; Kover, P. 1996. Evolution and stasis in plant-pathogen associations. Ecology 77 (4): 997-1003.
- Délye, C; Laigret, F; Corio-Costet, M.-F. 1997. RAPD Analysis Provides Insight into the Biology and Epidemiology of *Uncinula necator*. Phytopathology 87(7): 670-677.
- Dennis, R.W.G. 1950. An earlier name for *Omphalia flavida* Maubl. And Rangel. Kew Bulletin 3: 434.
- Erlich, HA. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. New York, Stockton. 246 p.
- Ferreira, ME; Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en análisis genético. 1 ed. Brasilia: EMBRAPA- CENARGEN. 220 p.

- Goodwin, SB; Sujkowski, LJ; Dyer, TA; Fry, BA; Fry, WE.1995. Direct detection of gene flow and Probable sexual reproduction of *phytophthora infestans* in northern North America. *Phytopathology* 85 (4) : 473-479.
- González, M; Rodríguez, R; Zavala, ME; Jacobo, JL; Hernández, F; Acosta, J; Martínez, O; Simpson, J. 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88(4): 292-299.
- Griffin, DH. 1994. *Fungal fissionology*. 2 ed. New York, USA, Willey-Liss. 458 p.
- Han, S; Evans, RG; Hodges, T; Rawlins, SL. 1995. Linking a geographic information system with a potato simulation model for site-specific Crop Management. *Environmental Quality*. 24:772-777.
- IICA. 1998. Boletín promecafé.ed. J.R. Hernández. E. L. Ibarra. Tegucigalpa, Honduras. Boletín 80, setiembre-diciembre. 1998. 20 p
- IICA.1999. Boletín promecafe. E. L. Ibarra ed. Guatemala, Guatemala. Boletín 81, enero-abril 1999. 20 p.
- Innis, M ; Gelfand, D ; Sninsky, J ; White, T.1990. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. San Diego, USA. Academic Press. 482 p.
- Leung, H; Nelson, RJ; Leach, JE. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Advances in Plant Pathology*. 27: 157-205.
- Mace, ME; Bell, AA; Beckman, CH. 1981. *Fungal wilt diseases of plants*. Academic press. Londres, Inglaterra. 640 p.
- Martínez W, O. 1995. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en investigación agrícola. *Agronomía Colombiana* 12(1): 66-71.
- Maublanc, A; Rangel, E. 1914. Le *Stilbum flavidum* Cooke, forme avorté de I' *Omphalia flavida* n.sp. *Bulletín de la Sociedad Mycológica*. (Francia) 30:41-47.

- Mercadal T, RA; Portillo, CA; 1990. Plagas y enfermedades más comunes del cafeto (*Coffea arabica*. L). Olancho, Honduras, Secretaría de Recursos Naturales, Escuela Nacional de Agricultura. 22 p.
- Mora, F.1990. Combate biológico de ojo de gallo *Mycena citricolor* Berk & curt Saac mediante el empleo de bacterias antagonistas en café. *In* Taller Regional sobre Roya, Ojo de Gallo y otras Enfermedades del Cafeto (1990, San José, Costa Rica).Resúmenes de las investigaciones, San José, C R. IICA/Promecafe /IDRC.
- Morris, PF; Connolly MS; St Clair, DA. 2000. Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research* 104(3):286-292.
- Murray, M.; Thompson, WF. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8:4321-4325.
- McDonald, BA; Mcdermott, JM; Goodwin, SB; Allard, RW. 1989. The population biology of host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 77-94.
- McDonald, BA; Mcdermott, JM; JM. 1993. Population genetics of plant pathogenic fungi. *Bioscience*. 43 (5): 311-319.
- Otero, A; De la cruz, M; Oyana, K.1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 85-117
- Paez P, CA. 1976. Factores que afectan el hiperparasitismo de *Trichoderma* spp. en el control biológico del ojo de gallo en el café causado por *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc. Tesis Lic. Ing. Agr. San José. Universidad de Costa Rica. 77 p.
- Peever, TL; Milgroom, MG. 1993. Genetic structure of *Pyrenophora teres* populations determined with random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Botany* 72: 915-923.

- Perry, BA; Desjardin, DE. 2001. Investigación Taxonómica del genero (Agaricales, Basidiomycota) en California (en línea). San Francisco, California. Consultado el 21 de noviembre del 2001. Disponible en www.Apsnet.org/meetings/2001/abstracts/m01ma130.htm
- Phillips, W; Escalant, JV. 1995. Caracterización molecular de los recursos fitogenéticos. *In* (Semana científica CATIE (2, 1995, Turrialba, Costa Rica). Resúmenes. Turrialba, CR. CATIE. p 4-6.
- Phillips M, W; Rodríguez, H ; Fritz, PJ. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de Trabajo, con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Turrialba, Costa Rica, CATIE. 183 p. (Serie Técnica. Informe técnico no. 252).
- Pollak, NL; Corbett, JD. 1993. Using GIS datasets to classify maize-growing regions in Mexico and Central America. *Agronomy Journal* 85:1133-1139.
- Powell, W. 1992. Plant genomes gene markers and linkage maps. In Moss, J.P. ed. *Biotechnology and Crop Improvement in Asia*. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi- Arid Tropics 297-322.
- Primer, S.M.2001. Concepts in GIS. Disponible en http://www.ce.vt.edu/program_areas/environmental/teach/smprimer/.
- Rafalski, J; Tingey, S; Williams, J.1991. RAPD markers, a new technology for genetic mapping and plant breeding. *AgBiotech News and Information* 3(4): 645-648.
- Rao, R.; Riley, K.1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter* 97:3-19.
- Rao, DV; Tewari, JP. 1987. Production of oxalic acid by *Mycena citricolor*, causal agent of the American leaf spot of coffee. *Phytopathology* 77: 780-785. Regalado O, A; Villanueva M, A. 1990. Enfermedades del cafeto. *In* El cultivo del cafeto en México. Xalapa, Veracruz, Instituto Mexicano del Café. P. 179-189.

- Rodríguez R, H. 1992. Uso de marcadores moleculares para la construcción de un mapa de ligamiento genético en cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 84 p.
- Romero, CS. 1988. Hongos fitopatógenos. 1ed. Luciano Tress V. México. 347 p.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural population. *Science*. 236: 787-792.
- Tanksley, SD. 1993. Mapping Polygenes. *Annual Review of Genetics* 27: 205-233.
- Tapia B, CG. 1998. Caracterización morfológica y molecular de la diversidad genética de la colección de *Pachyrhizus tuberosus* (LAM.) Spreng. del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica., CATIE. 157 p.
- Vakalounakis, DJ; Fragkiadakis, GA. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber: differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility, and RAPD fingerprinting. *Phytopathology*. 89(2): 161-168.
- Vargas C, L. 2000. Determinación de la enzima trehalasa en el hongo *Mycena citricolor*. In Simposio Latinoamericano de Caficultura (19, 2000, San José, Costa Rica).Memorias. San José, CR, IICA/Promecafe/ICAFFE. p. 355-364.
- Vargas, E. 1984. Interacción de tratamiento biológico y químico en el combate del ojo de gallo *Mycena citricolor* en el cafeto. *Agronomía Costarricense* 8(2): 91-97.
- Vargas, E; Umaña, G; Vargas, L; González, M. 1990. Epidemiología del ojo de gallo *Mycena Citricolor* en cafeto en diferentes zonas cafetaleras en Costa Rica. 12 Simposio de caficultura Latinoamericana. IICA, Costa Rica. p.191
- Vargas, E; Umaña, G.; González, M.; Vargas, L. 1991. Informe de avance de proyecto de ojo de gallo *Mycena citricolor* en cafeto. IDRC/Universidad de Costa Rica. p.3

- Vargas, E. 1995. Opciones al uso de fungicidas en café. García g, JE; Fuentes G, G; Monge Nájera, eds. *In Opciones al uso unilateral de plaguicidas en Costa Rica*. San José, Costa Rica, UNED. n.2, p 193-200.
- Vargas, V; Umaña, R, G; González L, M; Vargas G, E. 1990. Descripción de *Mycena citricolor* (Berk & Curt) SACC. In Taller Regional sobre Roya, Ojo de Gallo y otras Enfermedades del Cafeto. (1990, San José, Costa Rica). Resúmenes de las investigaciones. San José, CR, IICA/PROMECAFE/IDRC.
- Vásquez W, SA. 1998. Estudio de la variabilidad genética a nivel molecular y cuantitativo de seis procedencias de Caoba (*Swietenia macrophylla* King.) del área de Centroamérica y México. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 93 p.
- Wang, A. 1988. Variation in *Mycena citricolor* of coffee in Costa Rica. Tesis Mag.Sc., Alberta, Canada University of Alberta. 86 p.
- Wang, A; Avelino, J. 1999. El ojo de gallo del cafeto *Mycena citricolor*. In Desafíos de la Caficultura en Centroamérica. Bertrand, B; Rapidel, B. eds. San José, Costa Rica, IICA/PROMECAFE/CIRAD. p 243-260.
- Waugh, R.; Powell, W. 1992. Using RAPD markers for crops improvement. Trends in Biotechnology 10. 186-192.
- Welsh, J; McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 18: 7213-7218.
- Wilches M, A. 1995. Uso de los Marcadores moleculares RAPDs para evaluar La diversidad genética de los recursos genéticos de café (*Coffea arabica* L). Tesis Mag.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 63 p.
- Williams, JGK; Kubelik, AR; Livak, KJ; Rafalski, JA; Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18(24): 6531-6535.

Weising, K; Nybom, H; Wolf, K; Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in 1990. DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Ratón, Florida CRC Press. 322 p.

Welsh, J; McClelland, M.1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18(24): 7213-7218.

8. ANEXOS

ANEXO 1

**Registro de la información geográfica y topográfica de los sitios de colecta
de *M. citricolor*. CATIE, 2001.**

Código	Localización GPS	Altitud (msnm)	Pendiente %	Drenaje	Variedad	Densidad de siembra (p/ha)
Aleg-1	N 09° 85' 01.0" W 084° 35' 35.5"	1090	no	no	Caturra - Catuaí	15000
SMarc-2	N 09° 61' 89.7" W 086° 05' 83.1"	1621	90	no	Catimor - Caturra	20000
Ven-3	N 10° 21' 09.1" W 084° 16' 03.9"	447	no	no	nd	nd
SMig-4	N 10° 19' 59.1" W 084° 10' 17.5"	429	no	no	nd	nd
Sar-5	N 10° 09' 11.0" W 084° 20' 21.3"	1095	45	no	Caturra	nd
Sar-6	N 10° 09' 11.0" W 084° 20' 21.3"	1095	45	no	Caturra	nd
Ber-7	N 10° 00' 43.3" W 084° 28' 12.3"	1425	95	no	Catuaí - Caturra	20000
Ber-8	N 10° 00' 43.3" W 084° 28' 12.3"	1425	95	no	Catuaí - Caturra	20000
Par-9	N 09° 84' 19.5" W 083° 84.8' 45"	1340	5	no	Caturra - catimor	8500
Par-10	N 09° 84' 19.5" W 083° 84.8' 45"	1340	5	no	Caturra- catimor	8500
Camp-11	N 09° 89' 24.1" W 083° 68' 22.6"	625	30	bueno	Mezcla	15000
CAT-12	N 09° 89' 31.7" W 083° 65' 64.5"	nd	nd	nd	nd	nd
CAT-13	N 09° 89' 95.5" W 083° 65' 68.2"	nd	nd	nd	nd	nd
Pav-14	N 09° 88' 27.1" W 083° 62' 05.5"	1020	nd	bueno	Catuaí Rojo	5848
Pav-15	N 09° 88' 27.1" W 083° 62' 05.5"	1020	nd	bueno	Catuaí Rojo	5848
Jim-16	N 09° 80' 29.9" W 083° 71' 35.1"	1300	30	bueno	Catuaí	3500
Chi-17	N 09° 93' 36.8" W 083° 58' 54.8"	860	20	bueno	Caturra	4000
Chi-18	N 09° 93' 36.8" W 083° 58' 54.8"	860	20	bueno	Caturra	4000
Mir-19	N 10° 09' 15.8" W 084° 42' 14.6"	1090	30	nd	nd	nd
Plat-20	N 09° 15' 17.7" W 083° 64' 33.8"	946	10	no	Caturra	5000
Plat-21	N 09° 15' 17.7" W 083° 64' 33.8"	946	10	no	Catuaí	5000
Pej-22	N 09° 09' 71.9" W 083° 54' 56.8"	690	20	no	Caturra	4000
Caj-23	N 09° 26' 76.4" W 083° 63' 09.2"	480	30	no	Caturra	7000
SPed-24	N 09° 25' 28.5" W 083° 56' 08.1"	540	45	no	Catimor	Nd
SVit-25	N 08° 85' 00.7" W 082° 96' 79.5"	960	5	no	Caturra	3000
Hon-26	nd	1250	40	bueno	IHCAFE-90	3000

nd= dato no disponible

Continuación. Anexo 1.

Código	Edad del cultivo (años)	Sombra	Severidad %	Otras enfermedades	Control químico
Aleg-1	10	Mango, Naranja, Poro, Plátano	<20	Roya	Atemi
SMarc-2	4	no	>40	nd	Atemi
Ven-3	nd	nd	> 50	nd	nd
SMig-4	nd	nd	< 5	nd	Nd
Sar-5	10	Poro	15	Cercospora- Roya	Atemi
Sar-6	10	Poro	15	Cercospora- Roya	Atemi
Ber-7	15	no	> 50	Roya	Silvacur- Atemi
Ber-8	15	no	> 50	Roya	Silvacur- Atemi
Par-9	30	Poró	-5	Roya-Chasparria	No
Par-10	30	Poró	-5	Roya-Chasparria	No
Camp-11	Mezclado	Musa- Citricos- Frutales	90	Mal de hilachas- Roya	No
CAT-12	nd	nd	nd	nd	nd
CAT-13	nd	nd	nd	nd	nd
Pav-14	10	nd	< 10	Chasparria	Atemi
Pav-15	10	nd	< 10	Chasparria	Atemi
Jim-16	3	Poró	10	Chasparria	No
Chi-17	2	Laurel	30	nd	Amistar
Chi-18	2	Laurel	30	nd	Amistar
Mir-19	nd	naranja	nd	nd	nd
Plat-20	5	Guaba, Poró	<5	Roya	Cal con Silvacur
Plat-21	5	Guaba, Poró	<5	Roya	Cal con Silvacur
Pej-22	8	Guaba	5	Roya, mal de hilachas	no
Caj-23	3	Eucalipto	5	Roya, mal de hilachas	Cobres, Atemi
SPed-24	nd	Poro	< 50	Chasparria-Roya	nd
SVit-25	>3	Laurel	35	Roya	nd
Hon-26	5	Latifoliada	> 60	no	no

nd= dato no disponible

ANEXO 2

**Medio mineral utilizado en la producción de micelio de aislamientos del hongo
M. citricolor. Weising et al. 1995.**

Solución	Peso por reactivo	Dilución
A. Buffer fosfato	1.54 g/L KH_2PO_4 0.26 g/L K_2HPO_4	10 ml/L
B. Sales minerales y micro elementos	2.00 g/L NH_4NO_3 0.40 g/L Na_2SO_4 0.15 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/L $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 1.10 g/L CaCl_2	10 ml/L
C*. Solución de hierro	0.15 g/L $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	10 ml/L
D*. Solución de calcio	1.10 g/L CaCl_2	1 ml/L
Glucosa	-	30 g/L
Extracto de levaduras (Yeast extract)	-	2 g/L
Peptona	-	2 g/L
PH	-	6.0

*Solución C y D se esterilizan con filtros de $0.22\mu\text{m}$ y se adicionan luego al medio esterilizado.

ANEXO 3

**Protocolo MATAB (Mixed Alkyltri-Methylammonium Bromide).
Modificado en el laboratorio de biología molecular del CATIE, 2001.**

Soluciones utilizadas en el protocolo "MATAB "

Tampón sorbitol pH=8

Reactivo	Molaridad	Peso por 100 ml
Sorbitol	0.35 M	6.37 g
Tris	0.1 M	1.21 g
EDTA	0.005 M	0.188 g
Bisulfite de sodium	0.5 %	0.5 g

Tampón MATAB

Reactivo	Molaridad	Peso por 100 ml
TRIS	0.1 M	1.21 g
NaCL	1.25 M	7.30 g
MATAB	4%	4 g
EDTA	0.02 M	0.74 g

ANEXO 4**Metodología para la cuantificación de ADN con electroforesis en gel de agarosa.****Modificada en el laboratorio de Biología Molecular. CATIE, 2001**

- 1) Se prepara suficiente buffer para la cámara de electroforesis y para el gel.
- 2) Se Prepara 100 ml de una solución de agarosa al 0.8% en TBE 0,5X (200 ml para el análisis RAPD). Se calienta la solución en un horno microondas por espacio de tres minutos hasta que la agarosa se disuelva. Se recomienda detener a la mitad del tiempo de calentamiento para agitar la solución y así eliminar posibles grumos que ocasionarían defectos durante la electroforesis.
- 3) Mientras se disuelve la agarosa, se vierte 1 µl de bromuro de etidio en un erlenmeyer de 250 ml. Seguidamente se deposita la solución de agarosa dentro del erlenmeyer y se agita constantemente para homogenizar el líquido.
- 4) Sobre una cubeta para electroforesis se vierte el contenido del erlenmeyer de 250 ml, procurando cubrir totalmente la cubeta, acto seguido se colocan los "peines" en donde será depositado el ADN. Se deja secar el tiempo que sea necesario.
- 5) Se toma un tubo "ependorf" por cada muestra y se deposita los siguientes compuestos: 1 µl de ADN + 16 µl de H₂O + 2 µl de "loading buffer" Bpb = 20 µl.
- 6) Se prepara el marcador de pesos moleculares (Fago Lambda/Hind III) adicionando en un Eppendorf: 1 µl fago Lambda/Hind III (50 µg/µl) + 17 µl TE + 2 µl "buffer" BPb.
- 7) Se agita cada muestra con un vortex y se colocan en los pozos del gel con ayuda de una micropipeta. Se ubica el marcador de pesos moleculares estratégicamente.
- 8) Se llena la cámara de electroforesis con aproximadamente 1,5 l de "buffer" TBE 0,5 X hasta 0,3 cm por encima del gel se cierra la cámara de electroforesis, se coloca adecuadamente los cables, el negro en el cátodo y el rojo en el ánodo (el ADN corre hacia

- el ánodo) y se pone a funcionar hasta que las bandas muestren un adecuado nivel de avance (una hora aproximadamente).
- 10) Al finalizar la electroforesis se coloca el gel sobre la lámpara de luz ultravioleta, se observa el resultado de la electroforesis y se obtiene la fotografía del gel.
 - 11) Se determina la concentración de ADN comparando la intensidad de las bandas del marcador de peso molecular con las bandas obtenidas por las muestras.

ANEXO 5

Composición del buffer TBE 0,5X (Tris Borato EDTA). CATIE, 2001

Preparar una solución 5X de TBE de acuerdo a las proporciones que se indican a continuación:

SOLUCION	VOLUMEN TOTAL	
	0,5 l	1,0 l
EDTA 0,5 M pH 8	10 ml	20 ml
TRIS BASE pH 8	27 g	54 g
ACIDO BORICO	13.8 g	27.5 g
AGUA DESTILADA	0,5 l	1,5 l

Preparar 2,5 l de una solución 0,5X agregando 250 ml de TBE 5X en 2250 ml de agua destilada

Reactivos usados en el "loading buffer" BPb

REACTIVO	VOLUMEN (μ l)
Azul de bromofenol (Bpb)	100
Glicerol	500
EDTA 0,5 M pH = 8	100
H ₂ O destilada (aforar hasta)	10

ANEXO 6

Protocolo para el análisis RAPD. CATIE, 2001.

- 1) Se rotulan los tubos para cada muestra en los cuales se depositará los reactivos para la reacción y se colocaron en una gradilla sobre hielo picado.
- 2) A cada tubo se le adiciona los siguientes soluciones: 16.88 μ l de mezcla maestra + 0.165 μ l de Taq polimerasa (PERKIN ELMER) + 0.55 μ l del "primer" + 4.0 μ l de ADN (anexo 6).
- 3) Se cierran los tubos con sus respectivas identificaciones y se colocaran en un termociclador Perkin Elmer 9600.
- 4) El programa utilizado consistió de un ciclo inicial de desnaturalización de la cadena de ADN de 1 minuto 30 segundos a 95°C, seguido por 40 ciclos compuestos por: 10 segundos a 94°C (apertura de la cadena), 10 segundos a 37°C (unión "primer"-ADN) y 1 minuto 10 segundos a 72°C (unión de los "primers" a los sitios complementarios de la cadena disociada) y finalmente un ciclo de 2 minutos 30 segundos a 72°C, (de extensión de la cadena de ADN). Se deja enfriar la reacción durante 15 minutos a 4°C. Se deja enfriar la reacción durante 15 minutos a 4°C.
- 5) Una vez finalizado el proceso las muestras se someten a electroforesis como es indicado en el procedimiento para cuantificar el ADN, (anexo 4).

ANEXO 7

Preparación de mezcla maestra. CATIE, 2001

- 1) Se descongela cada uno de los reactivos en una gradilla sobre hielo picado. En el caso de la AmpliTaq se toma solo la cantidad necesaria para la reacción y acto seguido se devuelve al congelador.
- 2) En un tubo limpio y preferiblemente autoclavado se adicionan los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración		Volumen		26 muestras (μ l)
	inicial	final	1 muestra (μ l)	1 muestra + 10%(μ l)	
10 X Buffer II	10 X	1X	2,0	2,2	57,2
Mgcl ₂	25 mM	2 mM	1,6	1,76	45,76
Primer	15 μ M	0.375 μ M	0,5	0,55	14,3
Dntp	10 Mm	0.2 mM	0,4	0,44	11,44
Taq	5 u/ μ l	0.04 u/ μ l	0,15	0,165	4,29
Agua	-	-	11,35	12,485	324,61
ADN	5ng/ μ l	1 ng/ μ l	4,0	-	-
Total			20,0		

- 3) Los tubos se tapan y se colocan dentro del termociclador, se selecciona el programa y se pone a correr.

ANEXO 8

Diámetro de la colonia a los 8 días después de la inoculación, longitud de pedicelo y diámetro de la gema promedio a los 20 días después de la inoculación en 26 aislamientos de

M. citricolor.

Aislamiento	Diámetro de la colonia (mm)	Longitud de pedicelo (mm)	Diámetro de gema (mm)
Aleg-1	75.00	-	-
Smarc-2	80.67	1.49	0.24
Ven-3	79.00	0.94	0.25
SMig-4	76.67	0.89	0.23
Sar-5	68.67	1.06	0.22
Sar-6	80.00	-	-
Ber-7	72.00	-	-
Ber-8	76.00	-	-
Par-9	67.00	-	-
Par-10	73.00	1.06	0.26
Camp-11	68.50	1.02	0.25
CAT-12	65.33	1.08	0.24
CAT-13	68.50	1.36	0.22
Pav-14	73.00	0.98	0.26
Pav-15	76.00	1.18	0.25
Jim-16	79.50	1.13	0.24
Chit-17	68.50	-	-
Chit-18	80.00	-	-
Mir-19	79.50	1.05	0.31
Plat-20	63.33	-	-
Plat-21	74.00	0.92	0.23
Pej-22	71.50	1.09	0.23
Caj-23	75.00	1.54	0.26
SPed-24	81.00	1.04	0.20
SVit-25	71.50	-	-
Hon-26	75.00	-	-

ANEXO 9

Análisis de varianza y prueba Duncan para los promedios de la variable morfológica diámetro de la colonia (mm) de 26 aislamientos de *M. citricolor*.

Fuente de variación	GL	S.C	C.M	Valor de F	Pr > F
ENTRADA	3	517.6063187	258.8031593	47.35	<.0001
ERROR	22	125.7238095	5.4662526		
TOTAL CORREGIDO	25	643.3301282			

R-cuadrado C.V. Raiz CME Promedio de diámetro de la colonia

0.804573 3.169070 2.338002 73.7756 4 mm

$\alpha=0.05$

Grupos Duncan	Promedios	Nº Aislamientos	Grupos
A	79.933	5	2
B	74.905	14	3
C	67.119	7	1

ANEXO 10

Análisis de varianza y prueba Duncan para la variable cuantitativa longitud del pedicelo (mm) en 16 aislamientos de *M. citricolor*.

Fuente de variación	GL	S.C	C.M.	Valor de F	Pr > F
ENTRADA	2	0.00492697	0.00246349	0.06	0.9425
ERROR	13	0.53858488	0.04142961		
TOTAL CORREGIDO	15	0.54351185			

R-Cuadrado C.V. Raíz CME Promedio de longitud de pedicelo

0.009065 18.25797 0.203543 1.114815

$\alpha=0.05$

Grupos Duncan	Promedios	NºAislamientos	Grupos
A	1.1317	4	1
A	1.0949	7	2
A	1.1291	5	3

Nota: los aislamientos Aleg-1, Sar-6, Ber-7, Ber-8, Par-9, Chit-17, Chit-18, Plat-20, Svit-25, Hon-26 no produjeron pedicelo a los 20 días después de la inoculación.

ANEXO 11

Análisis de varianza y prueba Duncan para la variable cuantitativa de diámetro de gema (mm) en 16 aislamientos de *M. citricolor*.

Fuente de variación	GL	S.C	C.Medio	Valor de F	Pr > F
ENTRADAS	2	0.00082379	0.00041190	0.65	0.5367
ERROR	13	0.00819810	0.00063062		
TOTAL CORREGIDO	15	0.00902189			

R-Cuadrado C.V. Raíz CME Promedio de diámetro de gema

0.091310 10.27336 0.025112 0.244440

$\alpha=0.05$

Grupos Duncan	Promedios	Nº Aislamientos	Grupos
A	0.23224	4	1
A	0.24717	7	2
A	0.25038	5	3

Nota: los aislamientos Aleg-1, Sar-6, Ber-7, Ber-8, Par-9, Chit-17, Chit-18, Plat-20, Svit-25, Hon-26 no produjeron pedicelo a los 20 días después de la inoculación.

ANEXO 12

**Análisis estadístico para la variable rendimiento de micelio seco
en 26 aislamientos de *M. citricolor*.**

Fuente	g.l	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
Entrada	25	1.74500000	0.06980000	3.87	0.0005
Error	26	0.46880000	0.01803077		
Total corregido	51	2.21380000			

$$\alpha = 0.05$$

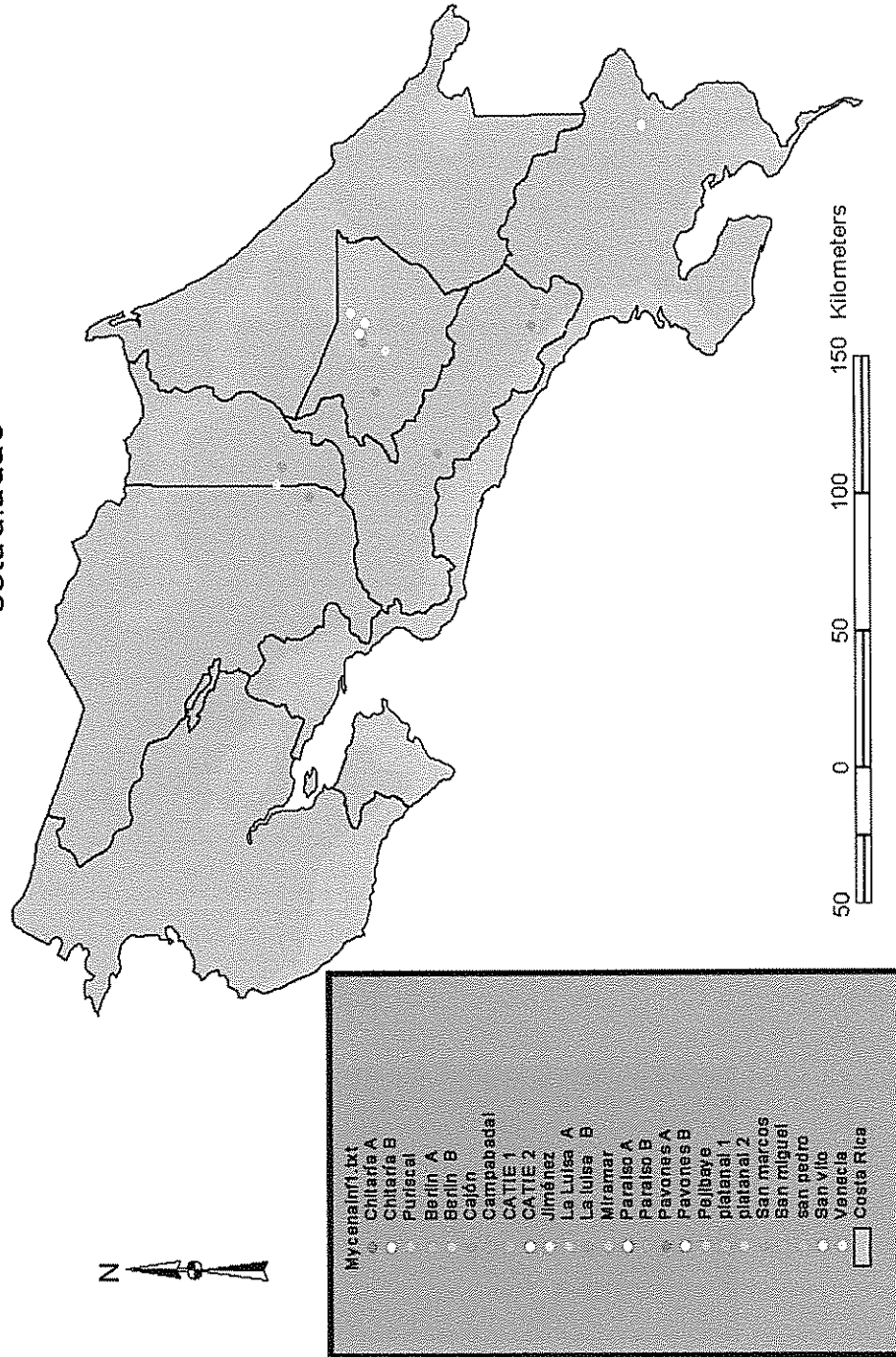
Sitio	Aleg-1	SMarc-2	Ven-3	SMig-4	Sar-5	Sar-6	Ber-7	Ber-8	Par-9
Jim-16	0.70000	0.67241	0.80000	0.74576	0.64516	0.62500	0.57143	0.59016	0.75000
Chit-17	0.70000	0.62500	0.73077	0.70175	0.52632	0.53333	0.57143	0.59016	0.75000
Chit-18	0.69643	0.58824	0.70213	0.69811	0.53704	0.51786	0.60656	0.57895	0.72340
Mir-19	0.64815	0.61538	0.64444	0.62000	0.48077	0.56897	0.48214	0.52727	0.63636
Plat-20	0.53704	0.52830	0.68627	0.61111	0.53448	0.49153	0.55556	0.55000	0.70588
Plat-21	0.59322	0.56140	0.73214	0.66102	0.56452	0.52381	0.49206	0.45763	0.72727
Pej-22	0.52727	0.46154	0.67308	0.62500	0.47368	0.43103	0.45000	0.43860	0.66667
Caj-23	0.53571	0.50000	0.70370	0.63158	0.48276	0.44068	0.45902	0.47458	0.72222
SPed-24	0.60000	0.56897	0.73684	0.66667	0.50000	0.50794	0.52308	0.53968	0.68519
SVit-25	0.66667	0.61111	0.60870	0.50000	0.56140	0.54237	0.60317	0.57627	0.50000
Hon-26	0.50943	0.47059	0.54348	0.46939	0.48214	0.43860	0.53226	0.50000	0.65306

Sitio	Par-10	Camp-11	CAF-12	CAF-13	Pav-14	Pav-15	Jim-16	Chit-17	Chit-18
Jim-16	0.67241	0.65000	0.61404	0.60000	0.63492	0.61290	0.00000	.	.
Chit-17	0.64912	0.50000	0.50943	0.57407	0.51724	0.49123	0.51852	0.00000	.
Chit-18	0.61538	0.59259	0.54902	0.56000	0.47170	0.50000	0.50000	0.33333	0.00000
Mir-19	0.58824	0.53846	0.52000	0.56000	0.55357	0.52727	0.58491	0.52941	0.51064
Plat-20	0.55556	0.53571	0.46154	0.47059	0.55000	0.52542	0.55357	0.57895	0.61818
Plat-21	0.61017	0.51724	0.55172	0.56140	0.48333	0.43103	0.55932	0.58333	0.59649
Pej-22	0.51852	0.47273	0.39216	0.40000	0.43860	0.49153	0.61667	0.59322	0.63158
Caj-23	0.55357	0.48214	0.46296	0.47170	0.44828	0.47458	0.60000	0.62295	0.61404
SPed-24	0.61667	0.52542	0.48214	0.54386	0.53968	0.51613	0.63492	0.59016	0.55357
SVit-25	0.46939	0.63793	0.60000	0.61111	0.55172	0.62295	0.67797	0.60714	0.64815
Hon-26	0.50000	0.56140	0.54545	0.55556	0.47368	0.52542	0.69355	0.62712	0.64286

Sitio	Mir-19	Plat-20	Plat-21	Pej-22	Caj-23	SPed-24	SVit-25	Hon-26
Jim-16
Chit-17
Chit-18
Mir-19	0.00000
Plat-20	0.61818	0.00000
Plat-21	0.64407	0.43636	0.00000
Pej-22	0.67797	0.28571	0.40000	0.00000
Caj-23	0.68333	0.36538	0.35185	0.22449	0.00000	.	.	.
SPed-24	0.55357	0.50000	0.43103	0.43860	0.39286	0.00000	.	.
SVit-25	0.64815	0.58929	0.59322	0.52727	0.56140	0.52632	0.00000	.
Hon-26	0.59259	0.50909	0.51724	0.55172	0.48214	0.55000	0.48077	0

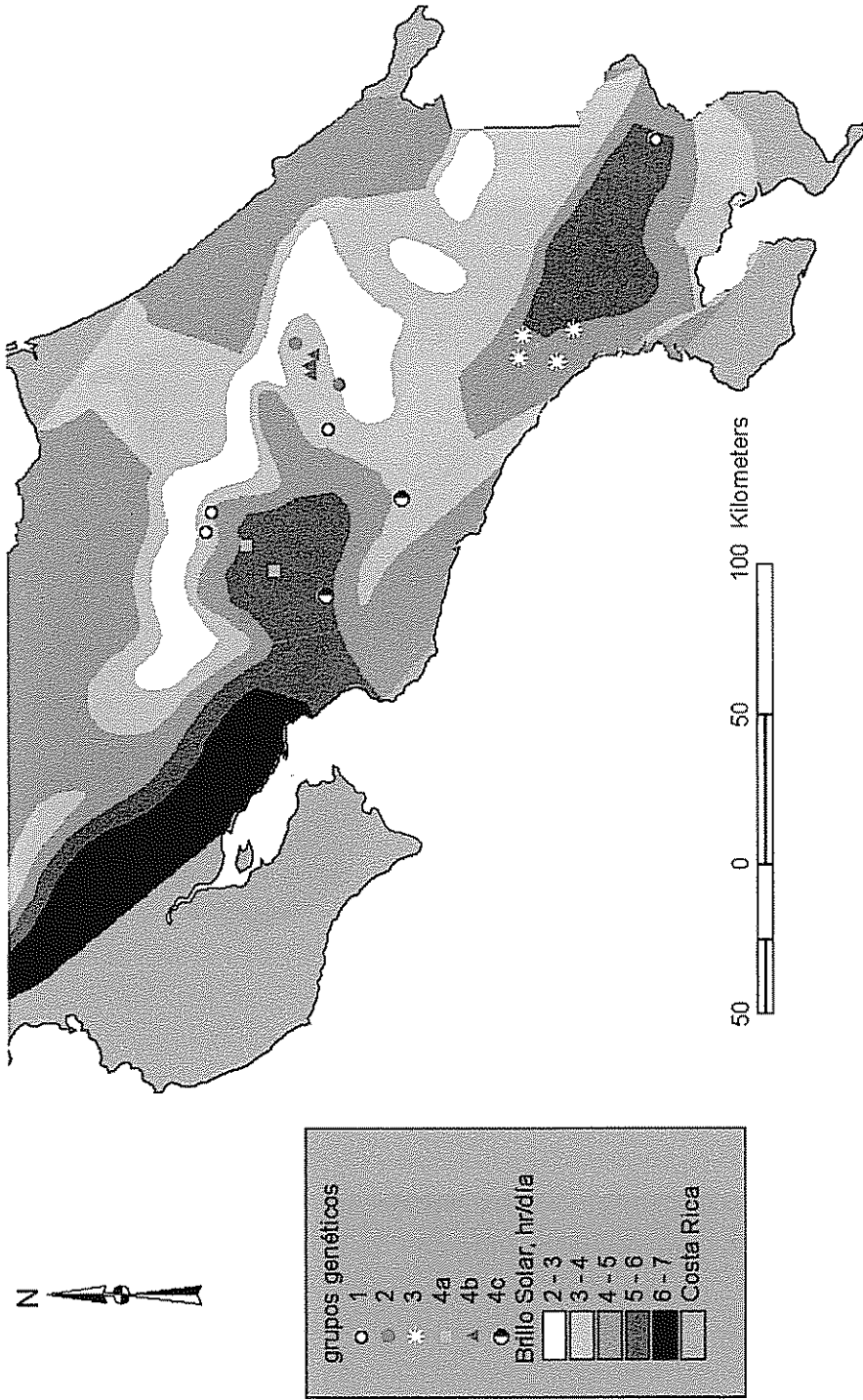
Anexo 14

Mapa I
Mapa de Costa Rica. Referencia geográfica de la
procedencia de las muestras de Mycena citricolor
estudiadas



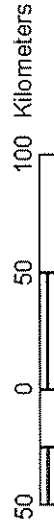
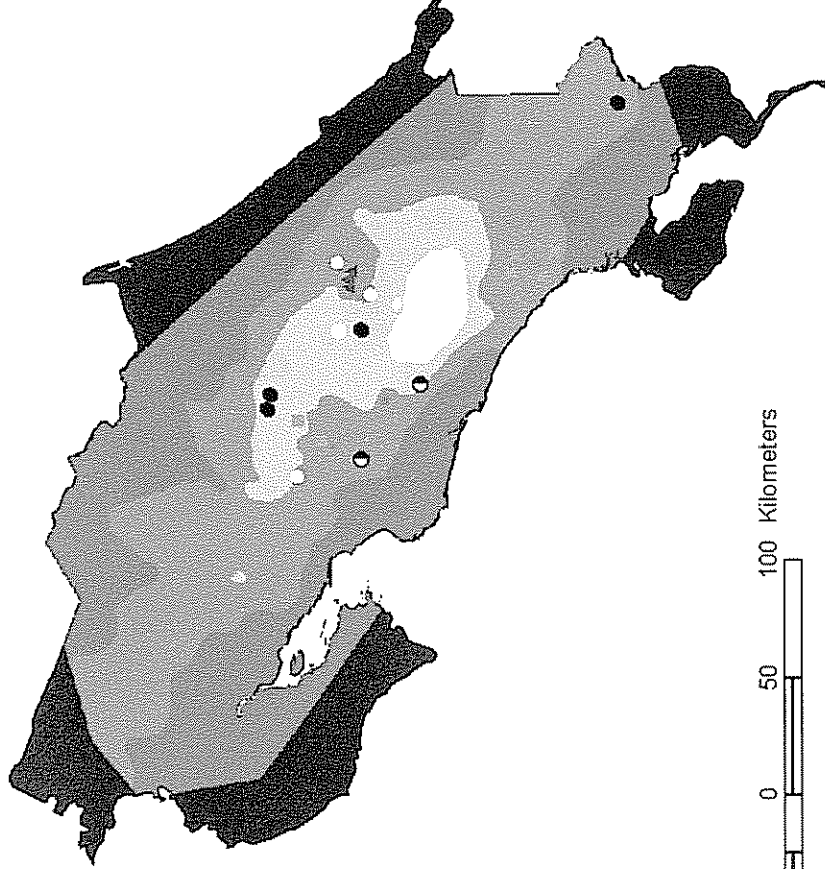
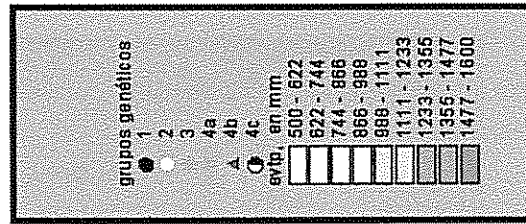
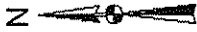
Mapa de brillo solar de Costa Rica. Ubicación de los grupos genéticos de *Mycena citricolor*.

Mapa 2



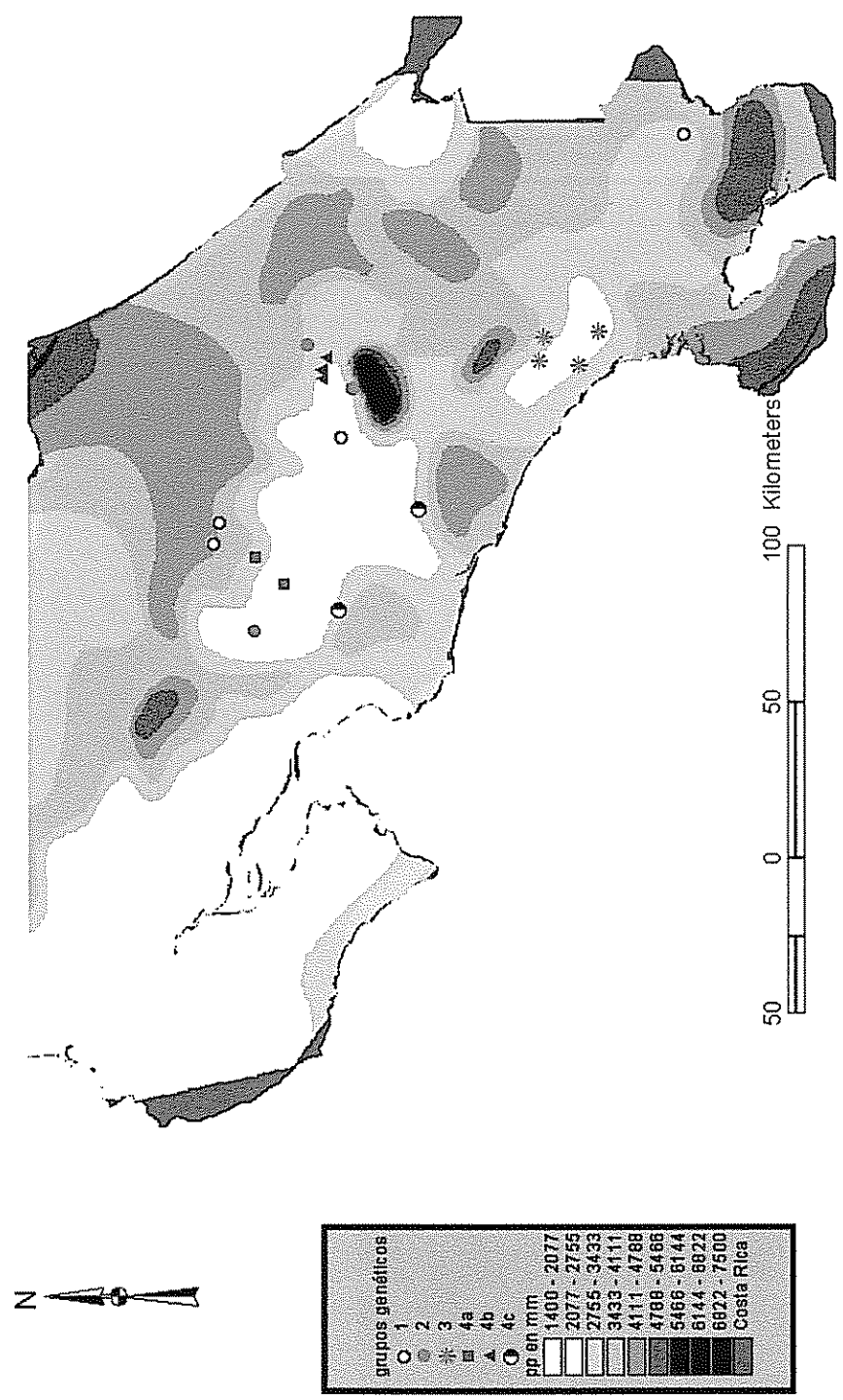
Mapa de evapotranspiración de Costa Rica.
Ubicación de los grupos genéticos de
Mycena citricolor estudiados.

Mapa 3



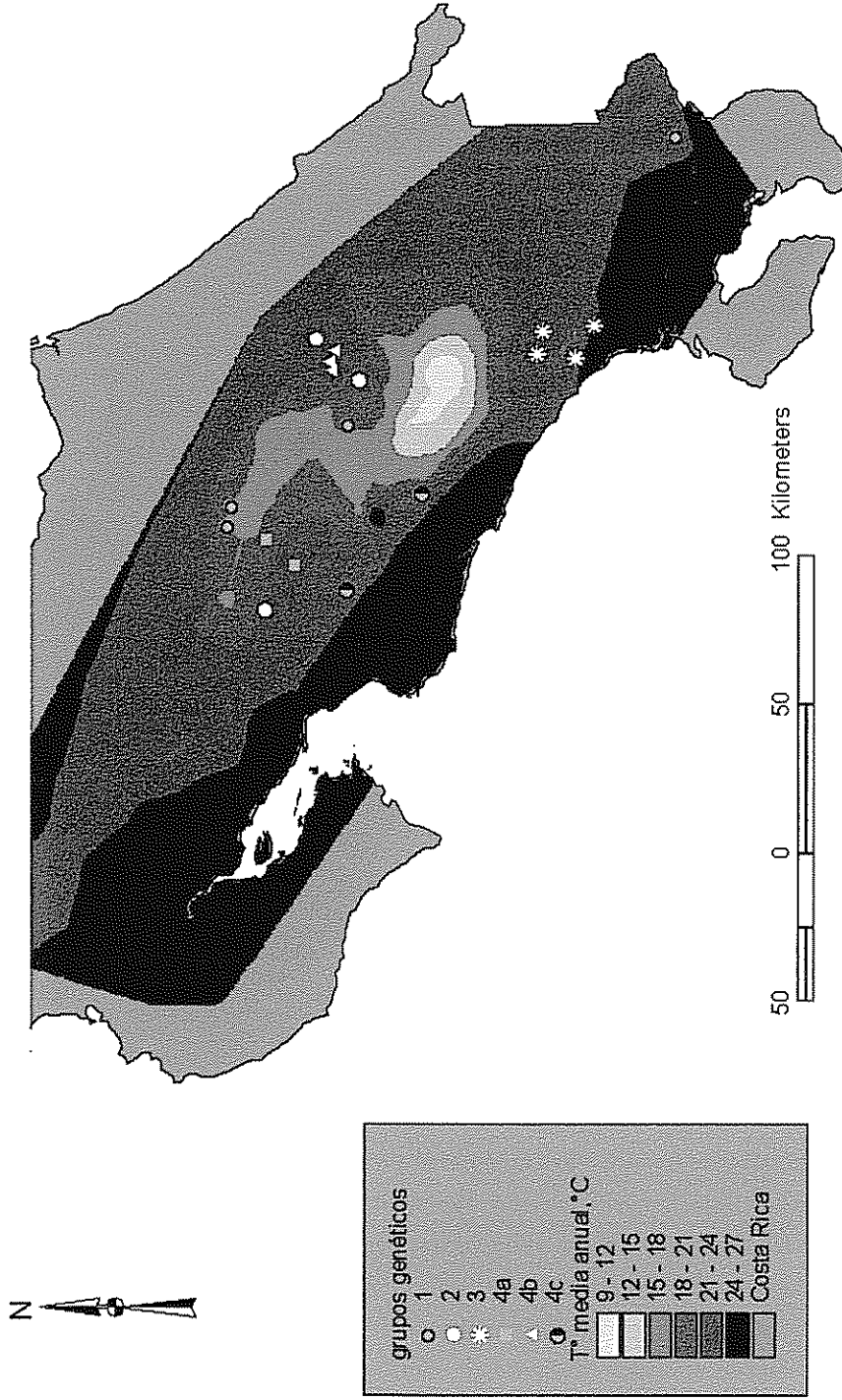
Mapa de precipitación pluvial de Costa Rica.
 Ubicación de los grupos genéticos de
Mycena citricolor estudiados

Mapa 4



Mapa de Temperaturas de Costa Rica. Ubicación de los grupos genéticos de Mycena Citricolor estudiados

Mapa 5



Mapa de costa Rica. Áreas propicias para el desarrollo de Mycena citricolor

Mapa 6

