

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary AISLADAS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) Y TOMATE DE MESA (*Lycopersicon esculentum*) EN LOS DEPARTAMENTOS DE NARIÑO Y PUTUMAYO.

**DORA INÉS ERASO
JENNY ORDÓÑEZ ORTIZ**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2005**

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary AISLADAS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*) Y TOMATE DE MESA (*Lycopersicon esculentum*) EN LOS DEPARTAMENTOS DE NARIÑO Y PUTUMAYO.

**DORA INÉS ERASO
JENNY ORDÓÑEZ ORTIZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
BIÓLOGO CON ÉNFASIS EN MICROBIOLOGÍA**

**DIRECTOR
M. Sc. LUZ ESTELA LAGOS MORA**

**CO-DIRECTOR
M. Sc. CARLOS BETANCOURT**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2005**

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Artículo 1ro del acuerdo no 324 de octubre 11 de 1996 emanado del Honorable Consejo Directivo de La Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

Directora

Co-director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2.005

AGRADECIMIENTOS

LAS AUTORES EXPRESAN SUS AGRADECIMIENTOS A:

LUZ ESTELA LAGOS MORA. M. Sc. Directora Departamento de Biología, Profesora Asistente. Universidad de Nariño.

CARLOS BETANCOURTH. M. Sc. Director Programa Ingeniería Agronómica. Universidad de Nariño.

MARIA ELENA SOLARTE. M. Sc. Profesora Asistente. Departamento de Biología. Universidad de Nariño.

JUAN GONZALO MORALOS OSORIO. Ingeniero Agrónomo. M. Sc. Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.

SONIA JARAMILLO VILLEGAS. M. Sc. Profesora asistente. Programa Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

JAIME EDUARDO MUÑOZ FLOREZ. Ingeniero Agrónomo. Especialista en Matemáticas. Director Laboratorio Integrado de Biología Molecular. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.

CESAR PONCE. Licenciado en Biología. Especialista en Microscopia. Universidad del Cauca.

GUIDO ERNESTO VILLOTA CALVACHE. Biólogo. Auxiliar de Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño.

ANDRES MAURICIO POSSO TERRANOVA. Ingeniero Ambiental. Auxiliar Laboratorio Integrado de Biología Molecular. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.

ANDRES JULIAN MONDRAGÓN. Ingeniero Agrónomo. Investigador Grupo Heliconias. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira.

OSCAR ALBERTO BURBANO FIGUEROA. Biólogo. Profesor asociado tiempo completo. Departamento de Biología. Universidad de Nariño.

WALTER VALLEJO. Especialista en Ecología. Laboratorio de Microbiología. Universidad de Nariño.

De manera especial, hacemos un reconocimiento a los señores agricultores de las diferentes zonas visitadas quienes con su ardua labor compartieron con nosotras sus diferentes saberes.

A la Universidad de Nariño, Universidad Nacional de Colombia Sedes Medellín y Palmira y Universidad del Cauca.

Y a nuestros amigos, compañeros y todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la culminación exitosa del presente trabajo.

DEDICATORIA

Quiero dedicar el éxito de este Trabajo y hacer extensivo el sentimiento de agradecimiento a todas aquellas personas que colaboraron con el desarrollo del mismo:

A Dios por ser la luz que nos guía hacia el camino del bien...

A mi hijo Mauricio por ser el motor y la fuente de mi vida, quien supo borrar cada gota de tristeza con sus travesuras y su inmenso amor.

A mis padres: Esperanza, Colmena y Neftaly, quienes me acogieron en su hogar, me llenaron de bendiciones cada día y me demostraron su apoyo incondicional, con el único fin de buscar el bienestar para nosotros... sus hijos,

A mis hermanos, primos y tíos

A la familia Salas Benavides y demás amigos.

DORA INES

DEDICATORIA

A Dios el guía de mi vida y amigo incondicional, en quien he encontrado la fuerza suficiente para vencer todos los obstáculos .

A mis padres Maria y Absalon quienes con su esfuerzo amor paciencia y total apoyo han sido mi fuente de inspiración y el principal motivo para superarme, haciendo de mí una persona perseverante que siempre esta dispuesta ha alcanzar sus metas.

A mis hermanos Deicy, Fernando y Yonny quienes con su amor y nobleza siempre están dispuestos a apoyarme en todo momento.

A mis sobrinos Luis Carlos y Laura Sofía quienes con sus travesuras y una sola sonrisa logran alegrar mis días.

JENNY

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. OBJETIVOS	22
1.1 OBJETIVO GENERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2. MARCO TEORICO	23
2.1 BIOLOGÍA DE <i>PHYTOPHTHORA INFESTANS</i>	23
2.1.1 Posición Taxonómica.	23
2.1.2 Ciclo Biológico.	25
2.2 IMPORTANCIA DE <i>Phytophthora infestans</i>	29
2.3 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE <i>Phytophthora infestans</i> .	29
2.4 RANGO DE HOSPEDEROS	31
2.5 MECANISMOS DE VARIACIÓN GENETICA EN <i>Phytophthora infestans</i>	34
2.6 CARACTERIZACION DE <i>Phytophthora infestans</i>	35
2.6.1 Análisis del genoma mitocondrial (ADNmt).	37
3. METODOLOGÍA	40
3.1 FASE DE CAMPO	40
3.1.1 Área de estudio.	40
3.1.2 Selección de variedades	42
3.2 FASE DE LABORATORIO	43

3.2.1 Aislamiento de <i>Phytophthora infestans</i> .	44
3.2.2 Multiplicación y conservación de <i>P. infestans</i> .	45
3.2.3 Reactivación de la cepa control.	46
3.2.4 Manejo de técnicas moleculares: PCR – RFLP's.	46
4. RESULTADOS Y DISCUSION	51
4.1 FASE DE CAMPO	51
4.1.1 Área de estudio.	51
4.1.2 Colección de muestras infectadas	51
4.2 FASE DE LABORATORIO	52
4.2.1 Aislamiento de <i>P. infestans</i> .	52
4.2.2 Mantenimiento de la colección de <i>P. infestans</i> .	54
4.2.3 Manejo de técnicas moleculares: PCR – RFLP's.	54
5. CONCLUSIONES	63
6. RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Principales géneros de plantas reportadas como hospederos de <i>P. infestans</i> a nivel mundial.	33
Tabla 2. Diversidad genética de poblaciones de <i>P. Infestans</i> en América del Sur	36
Tabla 3. Aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> colectados en 15 municipios. Departamentos de Nariño y Putumayo.	43
Tabla 4. Secuencia, longitud y posición de los "primers" empleados	47
Tabla 5. Cantidades para el Mix de PCR	48
Tabla 6. Condiciones para las Amplificaciones	48
Tabla 7. Cantidades para el Mix de Digestión	49
Tabla 8. Condiciones para las Digestiones	49
Tabla 9. Procedencia hospedante y local de <i>P. infestans</i>	51
Tabla 10. Haplotipos Mitocondriales de <i>Phytophthora infestans</i>	59
Tabla 11. Diversidad de <i>P. Infestans</i> en Solanáceas en Colombia	62

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i>	28
Figura 2. Representación del Genoma Mitocondrial de <i>P. infestans</i> . Ilustra la ubicación de varios productos de la amplificación	39
Figura 3. Mapa del departamento de Nariño, señalando las zonas muestreadas.	41
Figura 4. Mapa del Departamento de Putumayo Señalando las Zonas Muestreadas	41
Figura 5. Tomate de mesa (<i>L. esculentum</i>) infectada por el fitopatógeno <i>P. infestans</i>	42
Figura 6. Hojas de Papa (<i>S. tuberosum</i>) infectada por <i>P. infestans</i>	42
Figura 7. Técnica de desinfección	44
Figura 8. Aislamiento de <i>P. infestans</i>	45
Figura 9. Multiplicación de <i>P. infestans</i> en caldo arveja	45
Figura 10. Conservación de <i>P. infestans</i> en medios inclinados V8	46
Figura 11. Maceración con Nitrógeno líquido	47
Figura 12. Sistema de fotodocumentación para geles de agarosa.	50
Figura 13. Cultivo de micelio de <i>P. infestans</i> creciendo en medio V8	53
Figura 14. Microfotografía de <i>P. infestans</i> indicando el esporangio y el esporangioforo	53
Figura 15. Amplificación con Primer (F1-R1) que indica un fragmento de 1118 bp, <i>Solanum betaceum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>Solanum tuberosum</i>	55
Figura 16. Amplificación con Primer (F2-R2) que indica un fragmento de 1070 bp, <i>Solanum betaceum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>Solanum tuberosum</i>	55
Figura 17. Amplificación con Primer (F4-R4) que indica un fragmento de 964 bp <i>Solanum betaceum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> y <i>Solanum tuberosum</i>	56
Figura 18. Haplotipos mitocondriales de <i>P. infestans</i> . Evaluación con el primer 1 y Cfol. La flecha indica la posición de las bandas de los fragmentos digeridos. De izquierda a derecha: Marcador de Peso Molecular de 100 bp (promega), Fragmento digerido (Ia) y Fragmentos no digeridos (IIa)	57
Figura 19. Haplotipos Mitocondriales de <i>P. infestans</i> , Evaluación con el Primer 2 y Mspl. La flecha indica la posición y el peso de las bandas de los fragmentos digeridos. De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular de 100bp (promega) y los fragmentos digeridos: Haplotipo Mitocondrial (Ia) y Haplotipo Mitocondrial (IIa)	57

Figura 20. Haplotipos Mitocondriales de *P.infestans*, Evaluación con el primer 4y EcoRI. La flecha indica la posición y el peso de las bandas y de los fragmentos digeridos. De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular de 100bp (promega). Fragmentos digeridos: Haplotipo mitocondrial (Ia); y Haplotipo mitocondrial (IIa)

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Registro de colección	72
Anexo B. AGAR V8 MIX (Antibiótico y Fungicida)	73
Anexo C. Agar - V8	74
Anexo D. Caldo Arveja	75
Anexo E. Agar Arveja	76
Anexo F. Agar Avena	77
Anexo G. PDA	78
Anexo H. Protocolo para extracción de ADN de <i>P. infestans</i>	79
Anexo I. Protocolo modificado para extracción de ADN de <i>P. infestans</i>	80
Anexo J. Electroforesis del ADN - Preparación del Gel de Azarosa	81
Anexo K. Formato para PCR	82
Anexo L. Formato para Digestiones	83

RESUMEN

En diferentes zonas de los departamentos de Nariño y Putumayo, se colectaron 16 aislamientos de *Phytophthora infestans*, obtenidos de *Solanum betaceum* y *Lycopersicon esculentum*, los que fueron caracterizados genéticamente, mediante la técnica PCR –RFLP's del genoma mitocondrial según la metodología de Afanador *et al.*, (1993) y CIP (2000). Para la evaluación de los polimorfismos se realizó una amplificación del ADN extraído de micelio con 10 días de crecimiento en caldo arveja, con 3 pares de iniciadores (P1, P2, P4); luego se realizó la digestión con las enzimas CfoI, MspI y EcoRI respectivamente. Se identificaron dos posibles linajes clonales previamente reportados en el Ecuador; EC-1 que presenta el haplotipo mitocondrial IIa encontrado en dos aislamientos de *L. esculentum*; y el linaje clonal EC-3 con el haplotipo mitocondrial Ia, presente en 13 muestras de *S. betaceum* exclusivamente, del que no existe reporte alguno de su capacidad de infectar otros hospederos a diferencia de EC-1 que puede estar asociado a más de un hospedero. En Colombia no existen registros de poblaciones ni de caracterización genotípica de *P. infestans* antes de 1996, por consiguiente no se puede concluir definitivamente el reemplazo de un linaje clonal por otro; sin embargo los estudios en el mundo muestran que la sustitución puede darse por mutación o migración (Goodwin *et al.*, 1997). Considerando la posición geográfica de los departamentos de Nariño y Putumayo y el flujo constante de biodiversidad entre Ecuador y Colombia, el establecimiento de dos nuevos genotipos (EC-1 y EC-3) es evidente.

Palabras claves: *Phytophthora infestans*, *Solanum betaceum*, *Lycopersicon esculentum*, PCR –RFLP's, genoma mitocondrial, polimorfismos, linajes clonales, haplotipo mitocondrial, dinámica evolutiva.

ABSTRACT

Sixteen isolates of *Phytophthora infestans* were isolated from *Solanum betaceum* and *Lycopersicon esculentum* at several areas of Nariño and Putumayo department. They were genetically characterized using PCR-RFLP technique at mitochondrial genome according to the methodology employed by Afanador *et al.*, 1993 and CIP, 2000. Mitochondrial polymorphism analysis was achieved by DNA amplification using 3 pair of primers (P1, P2, P4) and digestion employing the enzymes CfoI, MspI and EcoRI respectively. It were identified to possible clonal lineage before report at Ecuador. To *L. esculentum* isolates show mitochondrial haplotype IIa, which is particular of clonal lineage EC-1. Thyrteen samples exhibit mitochondrial haplotype Ia, wich is representative of clonal lineage EC-3 hability infecting different host beside *S. betaceum*, as like EC-1 wich is able to infect inferent hosts. Before 1996 there isn't genotype characterization of population records of *P. infestans* at Colombia, this it can't strengthen replazing of a clonal lineage be other. However wordwide report show replacing by mutation on migration (Goodwing *et al.*,1997). Considering geographical placing of Nariño and Putumayo department and steady- biodiversity flow between Colombia and Ecuador is possible to give evidence two-clonal lineajes setting (EC-1, EC-3).

INTRODUCCIÓN

Según Jaramillo: “*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary es un microorganismo de gran importancia económica a nivel mundial, ya que es el agente causante de la enfermedad conocida como el tizón tardío o gota de la papa y el tomate. Esta enfermedad ha causado grandes pérdidas económicas, sociales y culturales como se puede referenciar en la famosa hambruna de Irlanda en la década de 1840, y en menor escala en otras partes del mundo”¹.

El control químico de la gota tiene efectos significativos en la rentabilidad del cultivo y la contaminación del medio ambiente. Sin embargo, hasta el presente, es una de las herramientas y estrategias más utilizadas, pues no se han establecido otros sistemas de control más eficaces, ya que el patógeno evoluciona permanentemente, hacia poblaciones cada vez más agresivas y resistentes a los fungicidas de tipo sistémico.

A partir del año 1980, el programa del tizón tardío de la papa del CIP (Centro Internacional de la Papa), Abad², inicio actividades de investigación en los Andes Suramericanos. Allí se encontró gran cantidad de hospederos en el Perú, Ecuador. Ordóñez³, 2000) y una gran diversidad y agresividad del patógeno en Rionegro, Colombia, razón por la cual, se consideró este lugar como el segundo sitio de diversidad de *P. infestans*.

Alder *et al.*, afirma que:

El hallazgo reciente del tipo de apareamiento A2 de *P. Infestans*, en especies silvestres de solanáceas, en papa en Bolivia y ambos tipos de apareamiento en pepino (*Solanum muricatum*) en el Ecuador (2002), da indicios de que tanto el patógeno como las especies hospederas han evolucionado en los Andes Suramericanos, razón por la cual es importante hacer estudios detallados de aislamientos y caracterización de *P. infestans* procedentes de diferentes zonas ecológicas y hospederos, dado el amplio rango de adaptación de las especies de

¹ JARAMILLO, S. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Medellín, 2003. p. 38. Monografía de grado (Biologo). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

² ABAD, Z. G . *Phytophthora infestans* en la zona Central del Perú: Razas, Patotipos, Especialización Fisiológica, Tipos de compatibilidad, Resistencia de variedad y Rangos de hospederos. Lima – Perú, 1983, p. 62. Tesis M.Sc. (M.Sc. en Agronomía). Universidad Nacional Agraria La Molina. Programa Académico de Graduados.

³ ORDOÑEZ, M.E. et. al. . A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans* attacks wild *Solanum* species in Ecuador. En: *Phytopathology*. Vol. 90 (2000); p. 197 – 202.

Solanum y donde la reproducción sexual pudiera ser parte importante del ciclo de vida del patógeno en el ecosistema andino⁴.

En la actualidad están registradas más de 100 especies dentro del género *Phytophthora*, las cuales se han identificado principalmente por características morfológicas de sus estructuras y por su patogenicidad a determinados hospederos. Los cultivos de papa y tomate son muy importantes para Colombia, no solo por lo que representan para la seguridad alimentaria del país, ya que son básicos en la canasta familiar, sino por la generación de mano de obra para las labores del cultivo, transporte, comercialización y transformación industrial que se traduce en una mejor calidad de vida para las personas vinculadas de manera directa o indirecta a dichas actividades y mayor desarrollo de los municipios, ya que ambos cultivos hacen parte de la cadena agroalimentaria (papa y hortalizas respectivamente), lo que amerita todos los esfuerzos encaminados a entender la biología y el control del patógeno *P. infestans*, que causa la principal enfermedad de estos cultivos, gota o tizón tardío entre otras denominaciones regionales.

Dada la importancia económica de este patógeno, este se ha estudiado, caracterizado y monitoreado en muchos lugares del mundo utilizando marcadores fenotípicos como tipo de apareamiento (Asexual - A1 y Sexual - A2), sensibilidad a fungicidas y fuentes de virulencia; y genotípicos como “fingerprinting” de ADN e isoenzimas entre las cuales las más trabajadas son Glucosa-6-fosfato isomerasa y Peptidasa. En la actualidad se emplean AFLP, SSR y PCR-RFLP del genoma mitocondrial, este último para monitoreo de las poblaciones por ser fácilmente detectables. Esta información en su conjunto permite dilucidar la estructura genética de las poblaciones del patógeno en estos lugares y utilizar esta información para diseñar estrategias de control acordes con su estructura poblacional.

Según Jaramillo: “en Colombia se han realizado trabajos sobre la caracterización genética de las poblaciones de *P. infestans* en épocas diferentes”⁵ y para los departamentos de Nariño, Antioquia y Boyacá, que indican la presencia del talo A1 exclusivamente; aislamientos de resistencia intermedia y sensibles al Metalaxyl; sensibles al Cymoxanil y la presencia de los linajes clonales EC-1 para cepas aisladas de *Solanum tuberosum* y US-1 para las cepas aisladas de otros hospederos diferentes a la papa; determinados por Haplotipos mitocondriales y caracterización aloenzimática.

⁴ ALDER, N., CHACON, M.G., FORBES, G.A., and FLIER, W.G. *Phytophthora infestans* Censu Lato in South America Population Substructuring through Host-specificity. Late blight managing the Global threat. Proceeding of the Global Initiative on Late blight Conference. Hamburg, Germany : Lizárraga, 2002 p. 13-17.

⁵ JARAMILLO, Op.cit., p. 38

En Ecuador los estudios de aislamientos colectados desde 1990 muestran el genotipo EC-1⁶ Forbes *et al.*⁷, para papa y un tipo de apareamiento A2 Ordóñez *et al.*⁸ encontrado en especies silvestres como *Solanum brevifolium* y *Solanum tetrapetalum*.

La ausencia de estudios de caracterización genética de aislamientos procedentes de Tomate de árbol y de mesa en el Departamento de Nariño y Putumayo dificultan en gran medida que se descarte la posibilidad de la presencia de nuevos genotipos que posiblemente han migrado del Ecuador debido al intercambio de productos agrícolas como importación de semillas de papa y tomate.

Con el propósito de contribuir al entendimiento de la estructura genética de *P. infestans* en Colombia, en el presente trabajo se caracterizó genotípicamente mediante la técnica de Polimorfismo de bandas electroforéticas PCR-RFLP's de ADN mitocondrial, las poblaciones de *P. infestans* provenientes de Tomate de árbol (*Solanum betaceum*), y Tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*), lo cual se constituirá en una importante base de información biológica y genética sobre este patógeno para desarrollar programas de manejo integrado de la gota de los hospederos en estudio en las diferentes zonas correspondientes a Nariño y Putumayo para evitar el desarrollo de la epidemia.

⁶ LAGOS, L. Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Departamento de Nariño. Cali, 2002, p. 45. Tesis M. Sc. (MSc. En Agronomía). Universidad del Valle.

⁷ FORBES, G.A., et. al. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. En: Phytopathology. Ecuador. Vol. 87, No. 4 (1997); p. 375 – 380.

⁸ ORDOÑEZ, Op.cit., p. 202

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genotípicamente aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes de Tomate de mesa, (*Lycopersicon esculentum*) Y Tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en los Departamentos de Nariño y Putumayo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ? Aislar *P. infestans* de Tomate de mesa y Tomate de árbol colectados en diferentes localidades de los Departamentos de Nariño y Putumayo.
- ? Caracterizar las poblaciones de *P. infestans* aisladas mediante el polimorfismo de bandas electroforéticas de ADN Mitocondrial a través de la técnica de PCR - RFLP's.
- ? Determinar molecularmente con base en los Haplotipos obtenidos el tipo de linaje clonal de las poblaciones de *P. infestans* de Nariño y Putumayo, procedentes de tomate de mesa y de árbol.
- ? Determinar la similaridad molecular de las poblaciones de *P. infestans* aisladas con las ya caracterizadas procedentes de papa (*Solanum tuberosum*) del departamento de Nariño.

2. MARCO TEORICO

2.1 BIOLOGÍA DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

2.1.1 Posición Taxonómica. Actualmente, *P. infestans* ya no pertenece al reino Fungi, se lo considera protista, dentro del reino Chromista⁹ con la siguiente ubicación

REINO:	Chromista (grupo Stramenophyla)
DIVISIÓN:	Heteroconta
CLASE:	Heteromycotina
PHYLUM:	Oomycota
SUBCLASE:	Saprolegniomicetidae
ORDEN:	Phytiales
FAMILIA:	Phytiaceae
GENERO:	<i>Phytophthora</i>
ESPECIE:	<i>infestans</i> ¹⁰ :

El Phylum Oomycota, perteneciente al reino Chromista, comprende más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen gametos masculinos y femeninos, con paredes formadas por celulosa o polímeros similares y tienen hábitos acuáticos y terrestres aunque siempre necesitan la presencia de agua.

Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, se agruparon originalmente como hongos¹¹), y más tarde fue confirmado por las filogenias moleculares basadas en las secuencias del ARN ribosomal, datos de los aminoácidos compilados para las proteínas de la mitocondria y cuatro proteínas que codifican para los genes cromosómicos, evidenciando que los Oomycetes adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente que los hongos verdaderos¹².

⁹ RAVEN, P.H., EVERT, R. F. and EICHHORN, S. E. Biology of Plant. 6 Ed. New York : WH Freeman and Company. 1999. p. 370.

¹⁰ ERWIN, D. C y RIBEIRO. O.K. *Phytophthora* Diseases worldwide. APS. Minesota : Press the American Phythopatological society. St Paul, 1996 p. 562

¹¹ Ibid., p. 370.

¹² KAMOUN, S. Basic Biology: Information of mechanisms that make *Phytophthora infestans* a pathogen. En: GILB'02 Conference late blight: Managing the Global treath. Abstract. Hamburg, Germany. (July – 2002); p. 11-13.

Los Oomycetes, están más relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametangios, por lo tanto sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide. Con micelio cenocítico muy desarrollado, del que se originan los esporangióforos y de estos los esporangios donde se desarrollan las zoosporas biflageladas (heterocontes), lo que significa que poseen flagelos en las zoosporas con longitud y ornamentación diferente. Los flagelos se presentan en pares, un flagelo largo y adornado con mastigonemas (pelos) distintivos (plumosos) y un flagelo mas corto, delgado, cilíndrico y en forma de flecha¹³.

Las características que diferencian el género *Phytophthora* de los hongos se basa en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) y la bioquímica de las paredes celulares, las cuales contienen microfibrillas de celulosa con una matriz amorfa de B'1-3-glucano y no de quitina, tampoco sintetizan esteroides pero los requieren de una fuente externa para la esporulación, tienen reproducción sexual, la mayor parte del ciclo de vida de ellos es diploide, mientras que en los hongos el ciclo de vida es haploide¹⁴. Deacon informa que los Oomycetes sintetizan la lisina mediante DAP (Ácido Diaminopimélico), mientras que los hongos lo hacen por la vía del AAA (Ácido Alfa- aminoadípico), surgiendo así una divergencia evolutiva entre Hongos y Oomycetes¹⁵.

Análisis de las secuencias moleculares de la subunidad 18S del ADN ribosomal claramente relacionan a los Oomycetes con las algas cafés, Diatomeas y Chrysophytas pero se separaron relativamente temprano de las formas pigmentadas¹⁶. Cavelier- Smith plantean que: "Evolutivamente los Oomycetes derivan de un ancestro que poseía zoosporas con dos flagelos de tamaño desigual (Heteroconte) y/o cloroplastos con envoltura de retículo endoplasmático"¹⁷.

Erwin y Ribeiro afirman así : "Aunque *Phytophthora infestans* no es considerado como un hongo, la terminología utilizada para su descripción sigue siendo la misma y los micólogos por las similitudes con los hongos estudian a *P. infestans* como tal"¹⁸

¹³ DEACON, J. Introducción a la Micología moderna. Mexico : Limusa. 1990, p. 85

¹⁴ Ibid., p.86

¹⁵ Ibid., p.87

¹⁶ Ibid., p.87

¹⁷ CAVELIER, SMITH, T. The kingdom Chromista: origen and systematics. En: Progress in Phycologia Research. Biopress, Bristol, England : J. Roed & D. J. Chapman, 1986, p. 309

¹⁸ ERWIN, D. C. y RIBEIRO, O.K. Op.cit., p. 562

2.1.2 Ciclo Biológico. *P. infestans* se reproduce de forma sexual y asexual, en esta última, que es la más frecuente, las zoosporas biflageladas se enquistan y se vuelven redondas, pierden sus flagelos y secretan una pared exterior. Robertson, sostiene que: “Penetran a la planta a través de una cutícula y las células epidermales proyectando un tubo germinativo que puede introducirse directamente o formar un apresorio”¹⁹ (ver figura 1.).

El micelio interior es intracelular y con presencia de haustorios Thurston afirma que: “Al desarrollarse la enfermedad, este micelio da origen a esporangióforos que aparecen a través de los estomas en correspondencia con el periodo en el cual las lesiones en los diferentes órganos vegetativos se vuelven evidentes”²⁰. El esporangióforo termina en un engrosamiento que posteriormente se separa en la forma de un esporangio alimonado²¹

Los esporangios son hialinos, con una pared delgada y presentan una papila apical, cuando el esporangio no termina directamente a través de tubo, los núcleos o el núcleo se divide para producir núcleos hijos, alrededor de los cuales se forman las zoosporas que salen generalmente en grupos de ocho, nadan libremente, se enquistan y germinan²²

Castañó, sostiene que: “La mayor esporulación se presenta con humedad relativa del 100 % o cercana a ella y a temperaturas alrededor de 16 y 22 °C. Los esporangios pierden viabilidad al cabo de 3 a 6 horas con la humedad relativa inferior al 80 %”²³ aunque Andrivon, demostró que: “Pueden permanecer viables en el suelo por varios meses dependiendo de las condiciones químicas, físicas y biológicas de este”.²⁴

La germinación de los esporangios tiene una duración de 0.5 a 2 horas, se produce cuando hay rocío o presencia de agua sobre las hojas del hospedero y dentro de un intervalo de temperatura entre 10 y 15 °C. Cuando los esporangios han germinado se requieren dos horas con una temperatura de 15 a 25 °C para la

¹⁹ ROBERTSON, N. F...The challenge of *Phytophthora infestans*. En: Advances in Plant Pathology. London. Vol. 7 (1991), p. 130

²⁰ THURSTON, H.D. and SCHULTZ, O. Late blight. En: Compendium of potato diseases. St Paul, Minnesota : s.n., 1990, p. 40

²¹ ROBERTSON, Op cit., p.65

²² Ibid., p.65

²³ CASTAÑO, Jairo. Manejo del tizón tardío de la papa: estado actual. En: Papas Colombianas. Con el mejor entorno ambiental. Resúmenes. Santa fe de Bogotá : s.n.,1996 p. 95

²⁴ ANDRIVON, D. Biology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. En: In soil. Mini Rev. Vol. 85, (1995), p. 1053

penetración de los tubos germinales en los tubos de la planta. Una vez adentro el micelio se desarrolla con mayor rapidez a una temperatura entre 17 y 21 °C, que también es óptima para que pueda esporular ²⁵

Fry argumenta que: “La reproducción sexual, se presenta porque *P. infestans* es heterotálico, requiere la interacción de las hifas de los tipos de apareamiento A1 y A2 para su recombinación sexual, uno de ellos forma anteridios y el otro oogonios²⁶. Sozli y Stauv sostienen que: ‘El talo del oogonio es rodeado por el anteridio y expande su fluido citoplasmático a través del talo oogonial. Todo núcleo del oogonio migra a la periferia donde es desintegrado y ocurre la meiosis. Desde el anteridio crece un tubo de fertilización que atraviesa la pared oogonial y el núcleo anteridial es depositado dentro del oogonio. El fruto de la unión del anteridio y el oogonio son las oosporas, estructuras que confieren variabilidad genética al patógeno e incrementan la complejidad genotípica²⁷. Donde Shattock asegura que: “La diversidad genética ocasionada por la reproducción sexual puede llevar a genotipos más agresivos dificultando el manejo de la enfermedad²⁸

Drenth sostiene: “Las oosporas garantizan la supervivencia del patógeno frente a condiciones adversas y son insensibles a funguicidas”²⁹ (*et al.*, 1995;) y como lo plantean Fry: “Las fallas en el control de la enfermedad por resistencia a fungicidas depende básicamente, de la variabilidad genética disponible”³⁰. Y, teniendo en cuenta que *P. infestans* es un patógeno obligado, la producción de oosporas elimina la dependencia de los tejidos del hospedero, incrementa la longevidad y la cantidad del inóculo, generando así un rápido reemplazo de las poblaciones asexuales por la reproducción sexual ³¹

²⁵ CASTAÑO, Op cit., p. 55

²⁶ FRY, et al. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways and implications. En: Plant Diseases Vol. 77, No. 7 (1993); p. 653

²⁷ SOZLY, D and STAUUV, T. accuracy of methods to monitor sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamide fungicides. En: Compendium of potato diseases. St Paul, Minnesota : s.n., 1990. p. 40

²⁸ SHATTOCK, et al. Genetics, of *Phytophthora infestans* : Determination of recombination, segregation and selfing by isozyme análisis. En : Phytopathology. Vol. 76 No. 4 (1986), p. 410

²⁹ DRENTH, et al. Formation and survival of sspores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. En : Plant Pathology. Vol. 44 (1995), p. 86.

³⁰ FRY., Op cit., p.526

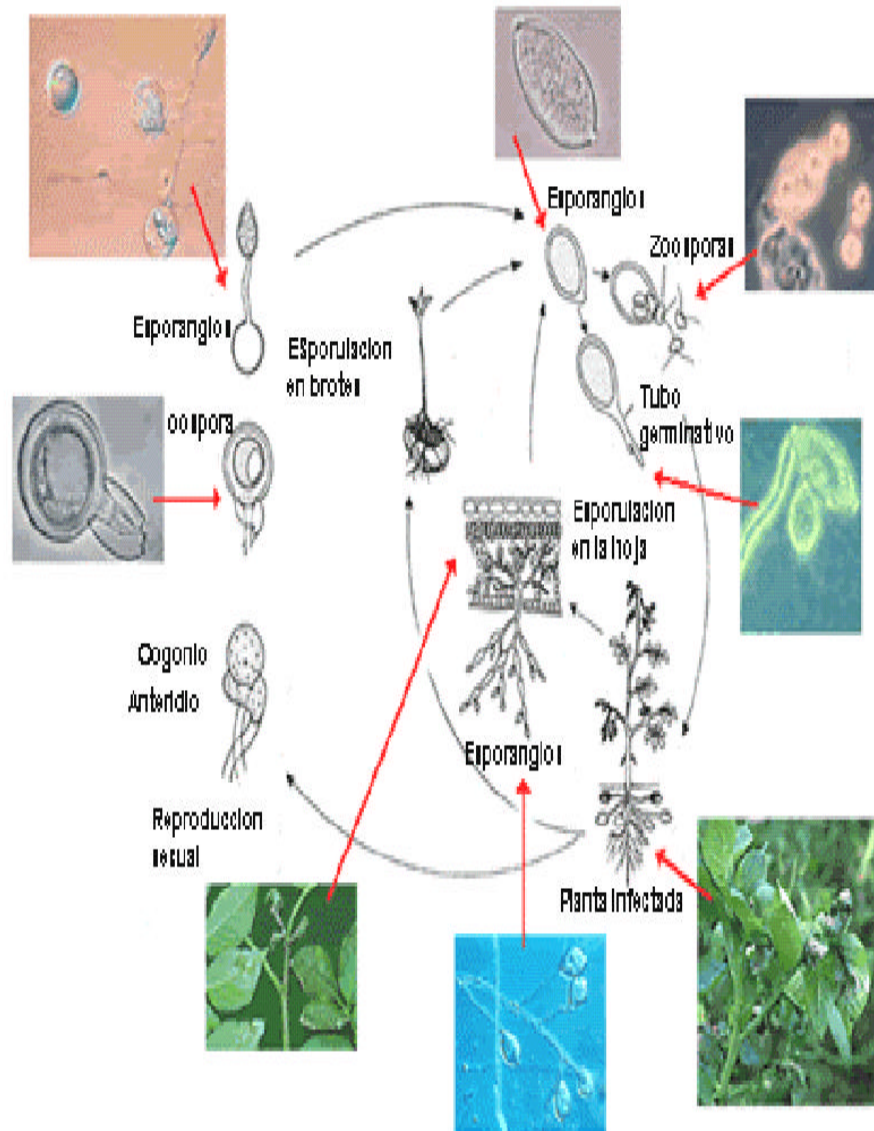
³¹ GOODGWIN, S.B. The Population Genetics of *Phytophthora*. En: Phytopathology. USA. Vol. 87, No. 4 (Abril, 1997); p. 462

El tipo de lesión causada por *P. infestans* varia con la temperatura, humedad, intensidad lumínica y variedad del hospedero. Los síntomas iniciales típicos se presentan como manchas pequeñas de color verde claro a verde oscuro, o forma irregular. Bajo condiciones ambientales favorables, las lesiones progresan, convirtiéndose en lesiones necróticas grandes de color castaño a negro purpúreo, que pueden causar la muerte de los folíolos y avanzar por los pecíolos hacia el tallo, finalmente la enfermedad puede matar la planta afectada.

Agrios plantea que “Frecuentemente, se encuentra presente un halo de color verde claro amarillento en la parte externa de la zona necrótica de la hoja; bajo condiciones favorables de humedad se forma un vello (mildiú) constituido por esporangios y esporangióforos en el borde de las lesiones, especialmente en la cara inferior de las hojas. En los frutos, se presentan manchas pequeñas extendidas alrededor de la corteza con una coloración café o negra hasta el interior del mismo”³²

³² AGRIOS, G. Fitopatología. México. Limusa. 1996. p, 303

Figura 1. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*



Fuente: <http://www.cals.ncsu.edu.plantpath.faculty.ristaino/graphics/fig1.gif>

2.2 IMPORTANCIA DE *Phytophthora infestans*

Phytophthora significa destructor de plantas y la especie *infestans*, es el agente causante del tizón tardío o gota, se constituye como el factor más limitante de la producción en la mayoría de las localidades donde se cultivan las diferentes especies de Solanáceas. Este patógeno muestra una gran virulencia en el cultivo del tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y papa (*Solanum tuberosum*). Marín afirma: “La enfermedad puede destruir el follaje, los tallos, el fruto o el tubérculo (en el caso de la papa), en cualquier momento del desarrollo de la planta y hasta el momento de su almacenamiento.”³³ (et al., 1998). Agrios sostiene que “La gota puede destruir totalmente todas las plantas de una zona de cultivo al cabo de una o dos semanas, cuando las condiciones climáticas son favorables y no se aplica ningún método de control”.³⁴

Robertson sostiene: “La importancia económica y social de *P. infestans* no solo se debe a su impacto sobre los productos básicos de la alimentación mundial, sino también, por las investigaciones generadas a su alrededor, contribuyendo al desarrollo de ciencias como la Fitopatología”³⁵

2.3 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE *Phytophthora infestans*.

Sobre el origen de este patógeno existen dos teorías: la teoría Andina tubo mucha fuerza a mediados de los años cincuenta, propuesta inicialmente por Berkeley en 1846 y luego soportada y documentada por de Bary en 1861. Andrivon se basó en el presunto de que “*Phytophthora infestans* se debió originar en la misma parte del mundo que su hospedero, en la parte norte de los Andes Sudamericanos (Perú y Bolivia); y la teoría mexicana, que según estudios recientes, es la más probable debido a que en México central fue el primer sitio donde se reportaron los dos tipos de apareamiento A1 y A2, la mayor diversidad genética detectada por aloenzimas y el mayor número de loci de virulencia”³⁶

³³ MARIN, M. Y MIRA, J.J. Caracterización de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislamiento de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, en diferentes piso térmicos y hospederos en el Departamento de Antioquia. Medellín, 1998, p. 56. Tesis Pregrado. Universidad Nacional de Colombia.

³⁴ AGRIOS, Op.cit., p. 295

³⁵ ROBERTSON. Op.cit., p. 30

³⁶ ANDRIVON, Op. cit., p 112

La extrema diversidad del patógeno en las poblaciones de México central ha sido ratificada actualmente con la utilización de técnicas moleculares³⁷

Fry et al, sostiene que ‘Los recientes estudios de migraciones del fitopatógeno indican que el tipo de apareamiento A1 migró de México a Europa en la década de 1840 y de aquí migró al resto del mundo por importación de semillas de papa; una segunda migración probablemente ocurrida desde México en los 70’s incluyó ambos tipos de apareamiento’³⁸

Fry & Goodwin plantean que: “Las migraciones al Asia tuvieron características diferentes a Europa, por cuanto solo se detectaron aislamientos de *P. infestans* con el tipo de apareamiento A2 en 1989 en Japón y Korea, con un genotipo alozimático y Fingerprinting del ADN diferente al de la población nativa y con marcada resistencia al Metalaxyl, la cual ha venido sustituyendo a las poblaciones originalmente establecidas en dicha zona”.³⁹

Abad registra que “Las migraciones en Suramérica presentaron el linaje clonal predominante a nivel mundial hasta entonces: US-1 con el tipo de apareamiento A1, con un amplio rango de especies hospederas (107) que son afectadas de manera natural o artificial.⁴⁰ Las colecciones de Bolivia han sido reportadas como tipo A2 con un solo linaje clonal, mientras en Brasil se han detectado dos clones con tipo de apareamiento A1 y A2 respectivamente y en Argentina se descubrieron aislamientos con tipo de apareamiento A2.”⁴¹

Forbes *et al.*, 1997 sugiere una hipótesis sobre la migración del patógeno de Colombia al Ecuador con la introducción reciente de un nuevo linaje clonal EC-1 que se estableció y desplazó al linaje antiguo US-1, refutando la propuesta de que existía una barrera dentro del Ecuador entre las poblaciones peruanas US-1 evaluadas en 1980 y una población diferente que había sido detectada en Colombia.⁴²

³⁷ CALDERON, H. J. y CASTRO M. Estructura Poblacional del fitopatógeno *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en los departamentos de Boyaca y Cundinamarca. Medellín, 2002 p. 31. Tesis pregrado. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias exactas y Naturales. Instituto de Biología.

³⁸ FLY, et al, Op cit., p. 450

³⁹ FRY, W.E. “On – line manual for *P. infestans* laboratory work”. Fry’s. Dr. Shaw’s Laboratory in Bangor, G. B., and in the laboratory of Dr. W. Flyer in Wageningen. U.S.A. : Laboratory in Cornell, 2001. p. 5

⁴⁰ ABAD, Z. G. Op.cit., p. 63.

⁴¹ FLY. WE y GOODWIN. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*, Op cit., p 412

⁴² FORBES, G.A., ESCOBAR, X.C., AYALA, C.C., REVELO, J., ORDOÑEZ, M.E., FRY, B.A., DOUCETT, K. and FRY, W.E. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. En: *Phytopathology*. Ecuador. Vol. 87, No. 4 (1997); p. 375

Oyarzún *et al.*, plantea: “En Ecuador se han registrado cuatro linajes clonales: US-1 antigua población, que prevalece en tomate, con el tipo de apareamiento A1 y el haplotipo mitocondrial Ib; el linaje clonal EC-1 que representa el 95 % de la población de *P. infestans* en dicho país y presenta el genotipo Pep 100/100 (96/100), con el tipo de apareamiento A1 y el haplotipo mitocondrial IIa. Población resistente a Metalaxyl, muy agresiva y que afecta solo a especies tuberíferas (petota); el linaje clonal EC-2 solo afecta a especies solanáceas silvestres no tuberíferas y representa el tipo de apareamiento A2 y finalmente la población EC-3 que es del tipo de apareamiento A1 y afecta a *S. betaceum*⁴³ .

Chacón *et al* afirma que: “Las huellas con la sonda RG-57 correspondieron para la sección petota al linaje clonal EC-1 y los linajes clonales EC-1, EC-2, EC-2.1, EC-3 y US-1 en la sección no petota (No Tuberíferas). Esto demuestra la gran diversidad genética de *P.infestans* en el Ecuador, en especies no tuberíferas, lo que puede ser similar a la situación que se presenta en Colombia, en donde se ha encontrado el predominio de aislamientos con haplotipo mitocondriales IIa y Ib en papa y Ib en tomate y pepino”⁴⁴ .

El grupo de investigación del patosistema *Phytophthora/Solanum* de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, ha encontrado que los aislamientos colectados y evaluados entre 1995 – 2002 exhiben características de las poblaciones EC-1 descritas por Forbes *et al.*, como tipo de apareamiento A1, los fenotipos de las isoenzimas Pep (96/100) y Gpi (90/100), resistencia al Metalaxyl y los haplotipos mitocondriales II-a, con mayor frecuencia en papa y Ib en tomate, así como también se ha observado la presencia del fitopatógeno en hojas de tomate de árbol y lulo (*Solanum quitoense*)⁴⁵ .

2.4 RANGO DE HOSPEDEROS

A pesar de que *P. infestans* es uno de los fitopatógenos mas estudiados a nivel mundial, poco se conoce acerca de su interacción con plantas Solanáceas o de otras familias. La literatura reporta hasta 107 hospederos de este patógeno, los cuales han mostrado reacción ante inoculaciones artificiales o exhiben síntomas o signos de la enfermedad en el campo (Tabla 1.).

⁴³ OYARZUN, P. J., POZO, A., ORDOÑEZ, M.E. DOUCET, K. and FORBES, G.A. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. En: Phytopathology. Vol. 88, No. 3 (1998); p. 265

⁴⁴ CHACON, G., ALDER, N., GESSLER, C., FLIER, W. and FORBES, G.A. Characterization of *Phytophthora infestans* on Wild and Cultivated Solanaceas in Ecuador. En: GILB'02. CONFERENCE: Late blight managing the Global threat. Hamburg, Germany. ABSTRACTS. (July, 2002); p. 11

⁴⁵ FROBES. et al, Op cit., p.241

Patiño plantea lo siguiente: “Aunque en las montañas Andinas se encuentra el hábitat de las principales plantas hospederas de *P. infestans*, se considera como centro de origen del patógeno, una zona diferente a esta zona (México central)”⁴⁶

Rivera indica que “Diferentes especies silvestres del género *Solanum* han sido fuente de diversidad y reservorio de la gota por un largo período de evolución en el Valle de Toluca, siendo algunas de las especies hospederas y de donde se aisló *P. infestans* las siguientes: *S. demissum*, *S. verrucosum*, *S. ipetalum*, *S. brachycarpum*, *S. stoloniferum*, *S. edinense* y *S. tuberosum*”⁴⁷.

Según Abad y Abad (1995) el rango de hospederos de *P. infestans* en el Perú incluye las formas cultivadas y silvestres de papa (*Solanum tuberosum*), tomate de árbol (*S. betaceum*) y tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*), además de otras especies de Solanáceas y miembros de otras familias botánicas tales como Nolanaceae. Algunas de las especies afectadas por *P. infestans* y donde se ha encontrado esporulación en forma natural en el Perú son: *Solanum medians*, *S. montanum*, *S. senecioides*, *S. tuberiferum*, *S. wittmackii*, *S. bukasovii*, *S. laxissimum*, *Nolana gayana* y *N. humicola*⁴⁸.

⁴⁶ PATIÑO, L. J., MORALES, J.G., BURITICA, P., ZAPATA, J.L. y JARAMILLO, S. Comportamiento ecológico y poblacional de la interacción de *Phytophthora infestans* con diferentes Solanáceas. En: Fitopatología Colombiana. Vol. 22, No. 2 (1997); p. 54

⁴⁷ RIVERA - PEÑA, A. Racial composition a population of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Toluca Valley and slopes of the Volcano Nevado de Toluca the period 1989 – 1994 . En: *Phytophthora infestans* 150. Mexico : s.n., 1995 p. 116

⁴⁸ ABAD, Z. G y ABAD, J. A. Historical evidence on the ocurrence of late blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. En: *Phytophthora infestans* 150. ABSTRACTS Germany : s.n., 1995 p. 36

Tabla 1. Principales géneros de plantas reportadas como hospederos de *P. infestans* a nivel mundial.

GENERO	No. especies	Primer reporte	Reportes
<i>Solanum</i>	64	Acosta, 1590	87
<i>Lycopersicon</i>	5	Payen, 1847	6
<i>Anthocersis</i>	1	Berkeley, 1846	2
<i>Schizanthus</i>	1	De Bary, 1876	1
<i>Petunia</i>	2	Smith, 1884	6
<i>Hyocyamus</i>	1	Viwinckle, 1936	1
<i>Lycium</i>	2	Viwinckle, 1926	2
<i>Physalis</i>	1	Peterson, 1947	1
<i>Salpiglosis</i>	1	Peterson, 1947	1
<i>Allium*</i>	1	Muller, 1950	1
<i>Beta*</i>	1	Muller, 1950	1
<i>Brassica*</i>	1	Muller, 1950	1
<i>Phaseolus*</i>	2	Muller, 1950	2
<i>Datura</i>	2	Hirst y Moore, 1957	2
<i>Mirabilis</i>	1	Romero y Fourton, 1965	1
<i>Mandrágora</i>	1	Sztenjberg y Wahl, 1965	1
<i>Nerium</i>	1	Sztenjberg y Wahl, 1966	1
<i>Nicotiana</i>	1	Sztenjberg y Wahl, 1966	1
<i>Phacelia</i>	2	Sztenjberg y Wahl, 1966	2
<i>Vca</i>	1	Sztenjberg y Wahl, 1966	1
<i>Withiana</i>	1	Sztenjberg y Wahl, 1966	1
<i>Aster**</i>	1	Tukesteen, 1973	1
<i>Bupleurum**</i>	1	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	1
<i>Erigeron**</i>	1	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	1
<i>Galinsoga**</i>	1	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	1
<i>Geranium**</i>	1	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	1
<i>Ipomoea**</i>	2	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	2
<i>Plygonum**</i>	1	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	1
<i>Rumex**</i>	1	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	1
<i>Sonchus**</i>	1	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	1
<i>Nolana</i>	2	Sheo Raj <i>et al.</i> , 1973	2

Fuente: Junchaya, 1983.

* Esporulaci3n en inoculaciones sucesivas.

** Manchas necr3ticas en condiciones naturales, esporulaci3n en tub3rculos de papa, luego de inoculaci3n con dichas manchas.

Sobre la relación patógeno–altitud han sido pocos los estudios realizados, Rivera-Peña confirma que: “En las pendientes del Volcán Nevado del Valle de Toluca (México) encontró que la infección de *P. infestans* sobre Solanáceas silvestres no se presentó por encima de los 3500 m.s.n.m, a pesar de la presencia de hospederos del patógeno a los cuales éste afecta a menores altitudes; la razón que propone el autor a este hecho es que por encima de esta altura las bajas temperaturas previenen el desarrollo del fitopatógeno”⁴⁹.

Patiño *et al.*, obtuvo: “Tres aislamientos procedentes de tres pisos térmicos (1450 msnm, 2250 msnm y 3000 msnm) y de diferentes hospederos (*S. muricatum*, *S. tuberosum* y *Lycopersicon esculentum*), en el Departamento de Antioquia, dichos aislamientos fueron inoculados en plantas correspondientes a 4 géneros diferentes (*Capsicum pubescens*, *Lycopersicon esculentum*, *Petunia híbrida*, *Solanum tuberosum*, *S. muricatum*, *S. nigrum*, *Solanum betaceum*,), como resultado de su investigación el autor sugiere que el aislamiento de *P. infestans* procedente de alturas más bajas (1450 msnm) tiende a ser más compatible afectando y reconociendo un mayor número de especies como posibles hospederos que los aislamientos de las zonas más altas”⁵⁰.

2.5 MECANISMOS DE VARIACIÓN GENÉTICA EN *Phytophthora infestans*

Goodwin, revela: “La mutación es el principal mecanismo de variación genética en el género *Phytophthora*. En *P. infestans* todos los miembros de un linaje clonal descienden de un grupo individual, siendo el más común alrededor del mundo el US-1, el cual corresponde al tipo de apareamiento A1 y al parecer se derivó de un ancestro Mexicano, los análisis de aislamientos US-1 han detectado algunas mutaciones en el ADN nuclear y mitocondrial, dichas variantes son idénticas al genotipo más común de su linaje, excepto por una o dos aloenzimas o cambios en el ADN “Fingerprinting”. Las mutaciones pueden ocurrir además por presión de fungicidas sobre las poblaciones del patógeno. Un ejemplo claro de ello, es el ancestro clonal de la línea US-1, el cual se caracterizaba por su extrema sensibilidad al Metalaxyl, en tanto que diferentes aislamientos obtenidos posteriormente, han presentado resistencia a dicho ingrediente activo; así mismo se ha atribuido a procesos mutacionales el cambio en el grado de virulencia observado en diferentes aislamientos del patógeno”⁵¹

⁴⁹ RIVERA, PEÑA, Op cit., p. 55

⁵⁰ PATIÑO *et al.*, Op cit., p. 25

⁵¹ GOODGWIN, Op cit., p. 321

Otro mecanismo de variación en *P. infestans* es la recombinación mitótica, Goodwin atribuye a ésta los cambios de locus heterocigóticos a homocigóticos, lo que implica que caracteres recesivos se expresen en el nuevo individuo homocigoto. Sin embargo, dicha variación no ha sido comprobada directamente, debido a falta de marcadores adecuados.⁵² “La recombinación parasexual es otro mecanismo de variación que se presenta muy frecuentemente en las poblaciones de *P. infestans*; generalmente a dicho fenómeno se le atribuye la mayoría de los cambios presentados en este patógeno”⁵³.

La introgresión por hibridación con otras especies de *Phytophthora* es otro de los mecanismos observados en *P. infestans*; híbridos interespecíficos entre *P. infestans* y *P. mirabilis* han sido obtenidos en laboratorio; Shaw reporta: “La presencia de oosporas en apareamientos de *P. infestans* y *P. phaseoli*, sustentando su origen a partir de la hibridación de estas dos especies”⁵⁴. Finalmente, Sujkowski y Fry plantean “La existencia de razas de *P. infestans* con elementos extranucleares transponibles capaces de incorporarse al genoma del patógeno”⁵⁵.

2.6 CARACTERIZACION DE *Phytophthora infestans*

P. infestans ha sido mundialmente estudiado y se han establecido marcadores para determinar la variabilidad de la población o polimorfismo genético. El polimorfismo genético se define como la variación en los rasgos hereditarios que pueden ser morfológicos, isoenzimáticos y moleculares que se refieren a las posibles variaciones a nivel de las secuencias de los nucleótidos del ADN genómico⁵⁶

En la caracterización de las poblaciones de *P. infestans* se emplean marcadores que pueden ser fenotípicos y genotípicos o moleculares. Los fenotípicos se consideran como el resultado de los efectos combinados de muchos genes y el ambiente, los más utilizados son: tipo de apareamiento, razas fisiológicas y resistencia a fungicidas. Los genotípicos o moleculares caracterizan el genotipo de un individuo a partir de muestras de células o tejidos, siendo los más empleados:

⁵² Ibid., p. 322

⁵³ SHAW. The cytogenetics and Genetics of *Phytophthora infestans*. P. 81 – 94. En: *Phytophthora* its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. St Paul: American Pathology Society, 1983. p. 155

⁵⁴ Ibid., p. 167

⁵⁵ FRY, W.E., GOODWIN, S.B., DYER, A.T., MATUZSAK, J.M., DRENTH, A., TOOLEY, P.W., SUJKOWSKY, L.S., KOOH, Y.J., COHEN, B.A., SPIELMAN, L.J., INGLIS, D.A. and SANDLAN, K.P. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways and implications. En: *Plant Diseases*. Vol. 77, No. 7 (1993); p. 653 – 661.

⁵⁶ CARTER, D.A., ARCHER, S.A., and BUCK, K.W. Restriction fragment polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. En: *Mycological Research*. London Vol. 94, No. 8 (1990); p. 1123 – 1128.

el análisis de isoenzimas, el análisis del genoma mitocondrial (ADNmt) empleando la técnica de PCR-RFLP's y el Fingerprinting de ADN nuclear empleando la técnica de RFLP's con la sonda RG57. CIP formula los que: "En general los anteriores marcadores definen los genotipos o linajes clonales de este patógeno: los loci de las isoenzimas Glucosa 6 fosfato isomerasa (Gpi) y Peptidasa (Pep), el tipo de apareamiento A1 y A2; el "Fingerprinting" de ADN dado por la ausencia o la presencia de bandas reveladas con la sonda RG57 y haplotipos mitocondriales que reconocen cuatro tipos denominados Ia, IIa, Ib y IIb"⁵⁷

Tabla 2. Diversidad genética de poblaciones de *P. Infestans* en América del Sur

País	Plantas Estudiadas	Tipo de Apaream.	Haplotipos	Linajes clonales
Argentina	Papa y tomates	A1, A2	I-a y II-a	AR-1, AR-2, AR-3, AR-4, AR-5, BR-1
Bolivia	Papa	A2	II-a	BR-1
Brasil	Papa y tomates	A1, A2	I-a, II-a	BR-1, US-1
Chile	Papa	A1, A2	I-b	US-1
Colombia	Papa tomates pepino y otras	A1	II-a, I-b	US-1, EC-1
Ecuador	Papa tomates pepino y otras	A1, A2	I-a, I-b, II-a, I-c	US-1, EC-1, EC-2, EC-3
Perú	Petota tomate y <i>S caripense</i>	A1	I-a, II-a, I-b	US-1, EC-1, PE-3, PE-5, PE-6
Uruguay	Papa	A2	II-a	BR-1
Venezuela	papa	A1	II-a, I-b	US-1, EC-1

Adaptado de Alder *et al.*, 2002

⁵⁷ CIP. Manual curso "Uso de Marcadores Moleculares en la Caracterización de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary" Molecular Plant Pathology. Centro Internacional de la Papa. Lima. Perú : CIP, 2000. p. 48

2.6.1 Análisis del genoma mitocondrial (ADNmt). Una forma valiosa de realizar el análisis del polimorfismo en el ADN es la comparación de perfiles de digestión producidos con endonucleasas de restricción, presentándose aumento o disminución de los sitios de corte. Carter et-al., asegura que “Estos cambios son conocidos como Polimorfismos en la Longitud de los Sitios de Restricción (Restriction Fragment Length Polimorphisms, RFLP)⁵⁸” y, Wang y Szmidt, sostienen que es “la metodología que permite analizar variaciones intraespecíficas de ADN nuclear y mitocondrial”⁵⁹

Henson y French citados por Wang y Szmidt sostienen que: “El análisis de RFLP’s, basada en la técnica de Southern blot, requiere de la extracción de altas cantidades de ADN purificado, sin embargo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerasa Chain Reaction, PCR) permite analizar secuencias específicas de pequeñas cantidades de tejido, es además una metodología rápida, sensible y específica que se puede realizar a partir de extractos crudos de ADN. La variación del fragmento amplificado puede ser analizada con digestión de enzimas de restricción y separación electroforética, sin necesidad de utilizar la hibridación con sonda”⁶⁰

Goodwin, afirma que: “El análisis del ADN mitocondrial es muy útil para estudios sobre eventos de migración los cuales han jugado un importante papel en la coevolución reciente de *P. infestans*”⁶¹. Taylor, citado por Wang y Szmidt manifiestan que “Debido a que el ADN mitocondrial (ADNmt) es heredado de la madre, su composición no se complica por la recombinación que ocurre generalmente en el núcleo como resultado de la recombinación sexual”⁶². Muñoz, J. y Enriquez, M. aseguran que: “De este modo la herencia materna del ADNmt arroja un panorama claro de la historia evolutiva de los linajes maternos”⁶³.

⁵⁸ CARTER, D. A., ARCHER, S.A., BUCK, K.W., SHAW, D.S., and SHATTOCK, R.C. DNA polymorphisms in *Phytophthora infestans*: the UK experience. En: *Phytophthora*. Cambridge University Press, Cambridge. (1991); p, 272 – 294.

⁵⁹ WANG, X. R.; SZMIDT, A. E. Molecular markers in population genetics of pathogen fungi. Departament of forest genetics and Plant Physiology. [en línea]. Swedish University of Agricultural Science. 1999 [citado Ago. 2004]. disponible en Internet : <URL :<http://kimura.genfys.sle.se/pgen/abstrac/xrwbook98htm>>

⁶⁰ Ibid., p

⁶¹ GOODGWIN, Op cit., p. 258

⁶² WANG, X. R.; SZMIDT, Op cit., p

⁶³ MUÑOZ, J. E. y ENRIQUEZ, M. A. Técnicas multivariadas en el análisis datos sobre caracterización molecular. Palmira : Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira, 2003. p. 36

Griffith & Shaw, diseñaron cuatro pares de “primers” o cebadores (P1, P2, P3 y P4) para la amplificación por PCR, de regiones polimórficas conocidas del genoma mitocondrial, de *P. infestans*. La digestión de los productos amplificados con enzimas de restricción (CfoI, MspI y EcoRI,) permitió la identificación de los haplotipos (Ia, Ib, IIa y IIb) previamente establecidos (Figura 2). Wang y Szmidt definen que: “La variabilidad de ADNmt ha sido empleada para diferenciar subespecies, grupos vegetativos incompatibles y poblaciones”⁶⁴; por estas posibilidades que brinda el ADNmt Klimczak y Prell⁶⁵, realizaron un mapa de restricción con 11 sitios de corte en el genoma mitocondrial de *P. infestans*. Con la enzima de restricción EcoRI y se encontraron cuatro variantes en el genoma mitocondrial de aislamientos de varias partes del mundo.

Carter *et al.*, afirman que:

Evaluaron nuevos aislamientos usando enzimas de restricción adicionales, y encontraron que inicialmente los análisis por RFLP’s dividen los aislamientos en dos grupos; el primero con 19 de los 24 aislamientos evaluados, presentó los mismos patrones a los encontrados por Klimczak and Prell, 1984, y el segundo con 5 aislamientos provenientes de Brasil, California y Egipto presentaban una inserción de 2 Kb en su ADNmt. El hecho de que esta inserción está en la misma posición sugiere un origen común a pesar de su distribución global. El ADNmt que no tiene la inserción se clasifica como Tipo I o forma A⁶⁶

Goodwin & Fry⁶⁷, argumentan “y el que la tiene como Tipo II o forma B. Estos dos tipos de genoma mitocondrial fueron posteriormente subdivididos usando las enzimas MspI y HhaI. Como dice Carter *et al.*⁶⁸ La digestión con MspI revela un sitio adicional en 4 de los 19 ADNmt Tipo I, y fue designado como Tipo Ib, y el que no lo tiene como Tipo Ia; otro sitio HhaI fue encontrado en 1 de 5 ADNmt tipo II y se designó Tipo IIb y los cuatro restantes como Tipo IIa.

Por su rentabilidad y fácil estandarización el empleo de la metodología de PCR-RFLP (Haplotipos mitocondriales) es una herramienta confiable y adecuada para la caracterización de la población del fitopatógeno. El hecho de que es empleada a nivel mundial para la caracterización de *P. infestans* permite la comparación de los resultados con el resto del mundo.

⁶⁴ WANG, X. R.; SZMIDT, Op cit., p. 12

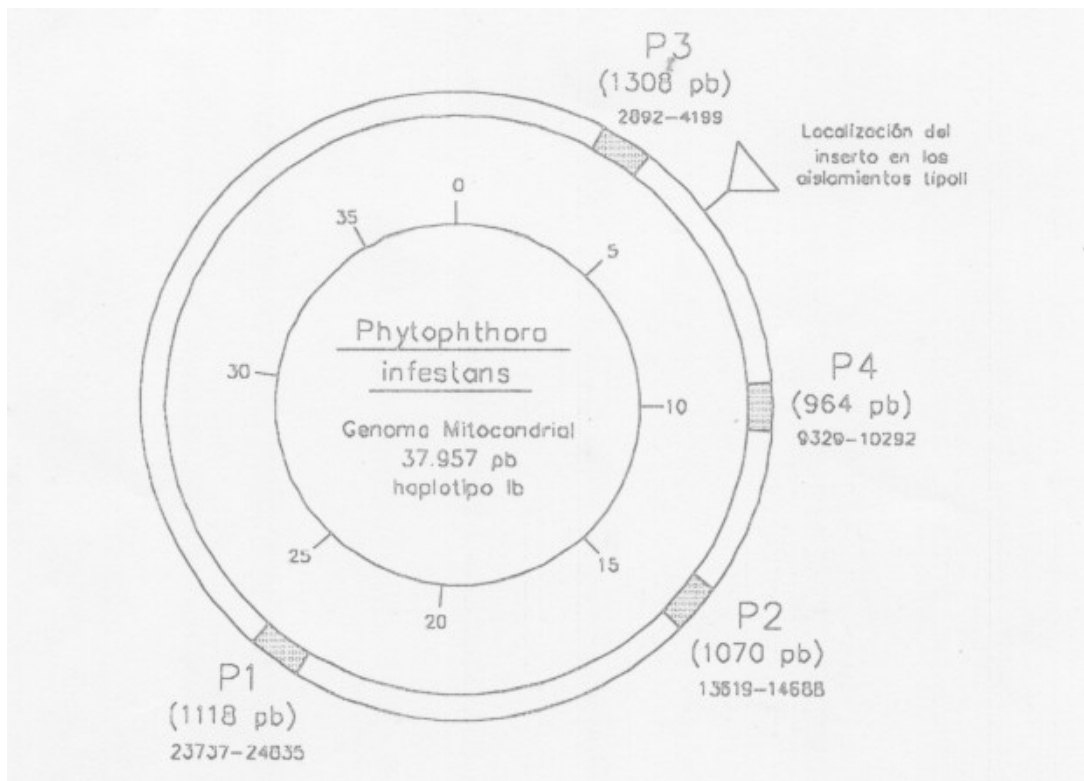
⁶⁵ KLIMCZAK, L.J., PRELL, H.H. Insulations and characterization of mitochondrial DNA of the oomycetous fungus *Phytophthora infestans*. *Curr-genet*. Berlin, W. Ger.: Springer International. Vol. 8, No. 4 (1984); p. 323-

⁶⁶ CARTER et al. Op.cit., p. 505

⁶⁷ GOODWIN & FRY, Op.cit., p. 258

⁶⁸ CARTER et al. Op.cit., p. 505

Figura 2. Representación del Genoma Mitocondrial de *P. infestans*. Ilustra la ubicación de varios productos de la amplificación (Griffith & Shaw, 1998)



Fuente : Griffith & Shaw, 1998

3. METODOLOGÍA

En la investigación desarrollada en este trabajo se tuvo en cuenta los siguientes aspectos:

- ? Localización de los cultivos afectados en los departamentos de Nariño y Putumayo.
- ? Aislamiento de *P. infestans* de Tomate de árbol (*S. betaceum*) y mesa (*L. esculentum*).
- ? Reactivación de cepas de *P. infestans* de papa (Lagos, 2002).
- ? Manejo de la técnica de PCR - RFLP's y electroforesis.

3.1 FASE DE CAMPO

Para la obtención de un adecuado muestreo se consideraron los siguientes aspectos.:

3.1.1 Área de estudio. Se seleccionaron 15 zonas de mayor producción de los frutales y prevalencia del patógeno, así:

Municipios: Pasto, Consacá, Tangua, Funes, Córdoba, Ipiales, Buesaco, San Bernardo en el Departamento de Nariño, y Colon y Sibundoy en el Departamento del Putumayo.

Corregimientos: Obonuco, Catambuco, Genoy, La Vega y San Juan en el Departamento de Nariño. (Figuras 3 y 4).

Figura 3. Mapa del departamento de Nariño, señalando las zonas muestreadas.

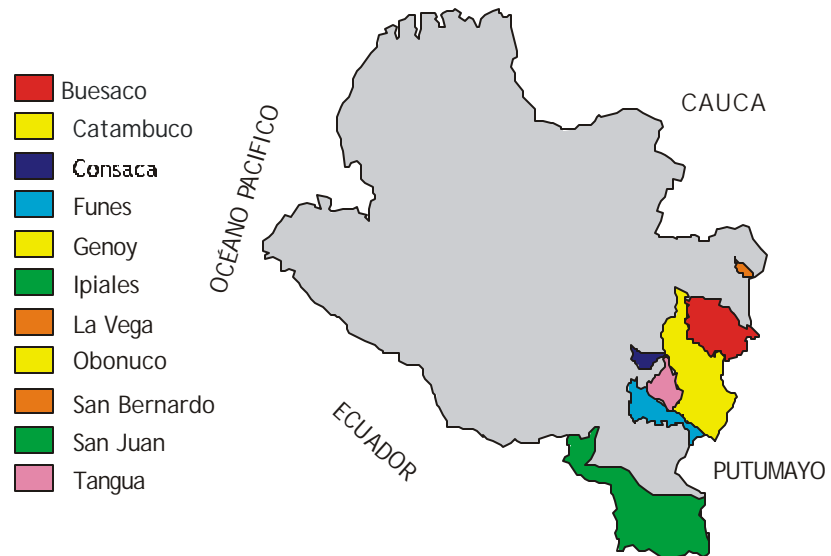
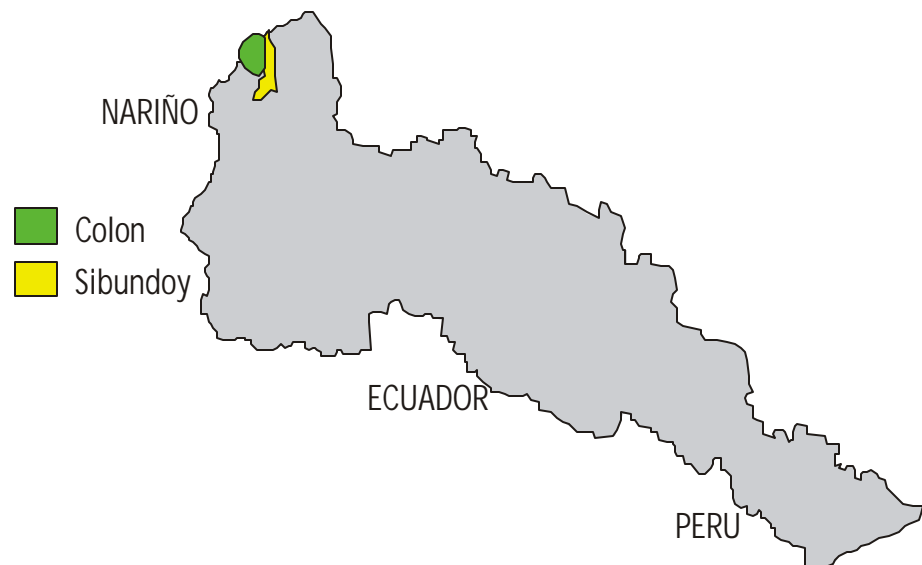


Figura 4. Mapa del Departamento de Putumayo Señalando las Zonas Muestreadas

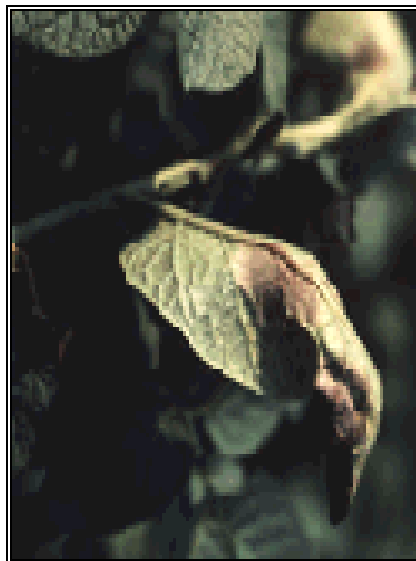


3.1.2 Selección de variedades. Para el desarrollo de la técnica de PCR – RFLP´s se utilizó ADN de *P. infestans* procedente de *S. betaceum* (Tomate de árbol) y *L. esculentum* (Tomate de mesa); y como testigo, ADN del patógeno aislada de *S. tuberosum* (Papa variedad parda pastusa) (Lagos, 2002) para determinar la similaridad molecular entre las poblaciones (Figuras 5 y 6)

Figura 5. Tomate de mesa (*L. esculentum*) infectada por el fitopatógeno *P. infestans*



Figura 6. Hojas de Papa (*S. tuberosum*) infectada por *P. infestans*



Para cada muestra se registraron los siguientes datos: fecha de recolección, número, zona de muestreo, altura, el propietario, especie afectada, edad del cultivo, tratamientos previos con productos químicos, frecuencia de aplicación y otras observaciones. Por medio de una encuesta (Anexo A) (Tabla 3).

Tabla 3. Aislamientos de *Phytophthora infestans* colectados en 15 municipios. Departamentos de Nariño y Putumayo.

No. Muestra*	Hospedero	Zonas de Muestreo
1 NSb13503	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Genoy
2 NSb13603	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Tangua
3 NSb13703	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	San Juan
4 NSb13804	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Ipiales
5 NSb13903	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Obonuco
6 NSb14003	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Catambuco
7 NSb14103	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Buesaco
8 NSb14203	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Funes
9 NSb14304	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	La Vega
10 NSb14404	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	San Bernardo
11 PSb14503	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Sibundoy
12 PSb14603	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Colon
13 NSb14903	T. árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Consacá
14 PLe14703	T. Mesa (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Sibundoy
15 NLe14804	T. Mesa (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	La Vega
16 NSt00299	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)**	Pasto

* El número de la muestra corresponde a la zona de colección: **N**, Nariño y **P**, Putumayo; la segunda y tercera letra indican el nombre científico del hospedero: **Sb**, *Solanum betaceum*, **Le**, *Lycopersicon esculentum* y **St**, *Solanum tuberosum*; los tres siguientes números indican el número de orden de las muestras colectadas y los dos últimos numerales, representan el año de colecta.

** Aislamiento procedente de *S. tuberosum* variedad Parda pastusa, código NSt00299, caracterizada por Lagos, 2002.

3.2 FASE DE LABORATORIO

Esta parte se desarrolló en los laboratorios de Biología Molecular, Microbiología, y la planta piloto de la Universidad de Nariño y el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira (UNAL PALMIRA).

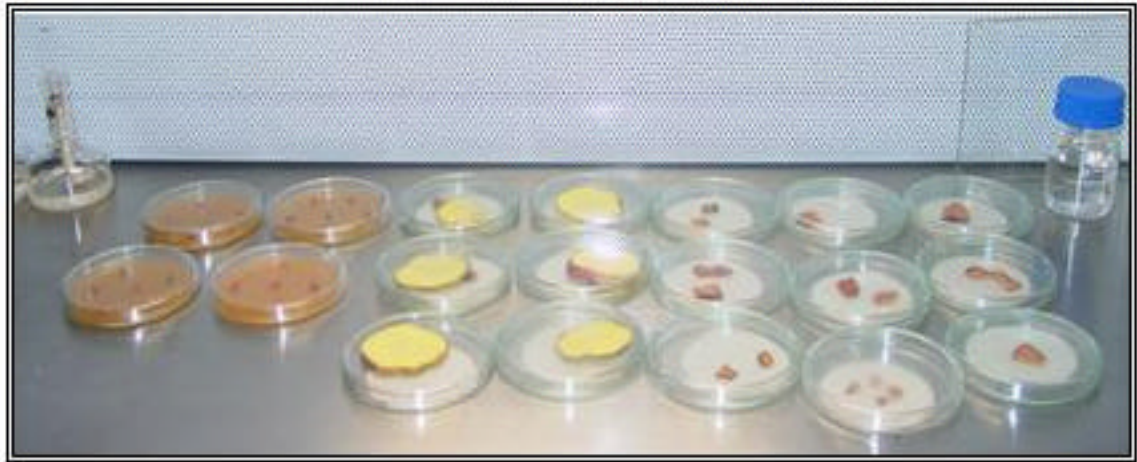
3.2.1 Aislamiento de *Phytophthora infestans*. Se colectaron folíolos, tallos y frutos que presentaban diferentes estados fenológicos de la enfermedad llamada “gota”, fueron previamente lavadas con agua destilada, y transportados en bolsas plásticas hasta el laboratorio.

Se realizó una desinfección con jabón antibacterial, alcohol al 70%, NaCl al 0.5% y varios enjuagues con agua destilada estéril, se cortaron en pequeños trozos y se colocaron en cámaras húmedas (cajas de petri con papel filtro humedecido), después de observar un ligero crecimiento del patógeno, se repicaron los materiales vegetales y/o micelios en cajas con Agar V8 Mix (Anexo B) para reducir el riesgo de contaminación por hongos, bacterias y levaduras; y a cajas de petri estériles con trampas (rodajas de papa variedad tuquerreña, la cual no posee genes de resistencia a *P. infestans*). Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente (12°C) y a condiciones de laboratorio durante el tiempo requerido (diez a quince días) para observar la formación de micelio, haciendo posteriormente varios repiques en Agar V8 Mix y V8 (Anexo B y C) para purificar los aislamientos (Fry, 2001) (Figuras 7 y 8).

Figura 7. Técnica de desinfección



Figura 8. Aislamiento de *P. infestans*



3.2.2 Multiplicación y conservación de *P. infestans*. La multiplicación del micelio puro de cada aislamiento se hizo en frascos de vidrio con Caldo arveja (Anexo D), se dejó crecer en condiciones de laboratorio durante 10 días y a 12 °C (Figura 9).

Figura 9. Multiplicación de *P. infestans* en caldo arveja



Fry afirma que: “Para la conservación de la colección de aislamientos, se multiplicó tomando pequeñas porciones de micelio a partir de cajas con colonias con buen crecimiento: se realizó siembras por triplicado de cada uno de los aislamientos de *P. infestans* en tubos inclinados y cajas petri con Agar V8 y V8 Mix, se esperó 15 días de incubación a 12°C para su respectivo crecimiento y luego se flamearon los tubos y se los almacenó en refrigeración (4°C)”⁶⁹ (Figura 10).

⁶⁹ FRY, OP.cit., p. 8

Figura 10. Conservación de *P. infestans* en medios inclinados V8



3.2.3 Reactivación de la cepa control. La reactivación de la cepa control aislada de papa (*Solanum tuberosum*) se realizó de tubos de conservación a caldo arveja, el cual le dio mucha viabilidad para seguir creciendo en cajas con medio V8, donde tuvo un crecimiento abundante de colonias de color blanco y de aspecto algodonoso al cabo de 5 días de su inoculación e incubadas a 12 °C.

3.2.4 Manejo de técnicas moleculares: PCR – RFLP's. La segunda parte de este estudio se desarrolló inicialmente en el laboratorio de Biología Molecular U. de N. y en el Laboratorio de Biología Molecular – UNAL PALMIRA, en donde se caracterizó genéticamente los 15 aislamientos de *P. infestans*, procedente de tomate de mesa y árbol de Nariño y Putumayo, en comparación con un aislamiento caracterizado del patógeno proveniente de papa Nariñense.

Antes de llevar a cabo la técnica de PCR – RFLP's se procedió a realizar nuevas réplicas de los 16 aislamientos de *P. Infestans* (Tabla 3) para garantizar su viabilidad, las cuales se manejaron con estrictas normas de seguridad para evitar cualquier tipo de contaminación o dispersión de las estructuras reproductivas.

? **Análisis por PCR – RFLP'S del genoma mitocondrial (ADNmt)**

? **Extracción de ADN de *P. infestans*.** A partir de los aislamientos cultivados durante 10 días en medio líquido arveja se cosechó el micelio, se filtró en una bomba de vacío y se maceró con nitrógeno líquido, almacenando el pulverizado en tubos Eppendorf de 1.5 ml e inmediatamente transportadas al freezer a -80 °C

Figura 11. Maceración con Nitrógeno líquido



Se procedió a la extracción del ADN según la metodología propuesta por Afanador *et al.*, 1993 y modificada por Posso, Eraso y Ordóñez, 2004 (Anexo H e I). Se evaluó la calidad del ADN mediante la visualización con un trasiluminador de geles de agarosa coloreadas con Bromuro de etidio (Anexo J).

? **Condiciones de PCR.** Para la evaluación de los polimorfismos se realizó una Amplificación del ADN con tres pares de iniciadores: "primers" 1, 2 y 4 (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Secuencia, longitud y posición de los "primers" empleados

Primer	Secuencia	Longitud del Primer (PB)	Posición
F1	5'-GCAATGGGTAAATCGGCTCAA-3'	21	23737-23757
R1	5'-AAACCATAAGGACCACACAT-3'	20	24835-24854
F2	5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT-3'	21	13619-13639
R2	5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3'	22	14688-14667
F4	5'-TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT-3'	22	9329-9350
R4	5'-CCGATACCGATACCAGCACCAA-3'	22	10292-10271

* Las posiciones indicadas se refiere a la posición del "Primer" en el genoma mitocondrial de

Phytophthora infestans en relación con el origen (extremo 5' de la subunidad grande del gen mitocondrial del ARNr) (Griffith & Shaw, 1998).

Cabe anotar que no se empleó el Primer 3 porque al igual que el Primer 4 discrimina los mismos Haplotipos mitocondriales Ia, Ib y IIa, IIb. Se utilizó un formato para cada primer, especificando las cantidades de los reactivos utilizados en las amplificaciones (Anexo K).

Tabla 5. Cantidades para el Mix de PCR

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Vol. muestra
Primer Forward	5 µM	0.34 µM	1.7 µl
Primer Reverse	5 µM	0.34 µM	1.7 µl
DNTPs	1,25 mM	0.2 mM	4 µl
BSA	10 tg/ µl	160 µg/ml	0.4 µl
ADN		4 ng	0,5 µl
MgCl ₂	25 mM	2.75 mM	2.75 µl
Buffer PCR (Taq)	10 X	1X	2.5 µl
Agua			11.25 µl
TAQ Polimerasa	5 U	1 U	0.2 µl
TOTAL			25 µl

Ensayo sugerido por: MORALES, J. G. y adaptado POSSO, A. M. Laboratorio de Biología Molecular Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira. 2004.

Los programas que se registraron en el Termociclador para realizar las amplificaciones para cada para de cebadores fueron los siguientes: (Tabla 6.)

Tabla 6. Condiciones para las Amplificaciones

PRIMER Nombre del Programa	PRIMER F1-R1 Y F4-R4 PHYTO			PRIMER F2-R2 PHYTO 5		
	Temp.	Tiempo	Ciclos	Temp.	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	90 seg.	1	94°C	90 seg.	1
Desnaturalización	94°C	40 seg.	40	94°C	40 seg.	40
Hibridación del iniciador	55 °C	60 seg.		63°C	60 seg.	
Extensión del iniciador	72 °C	90 seg.	1	72 °C	90 seg.	1
Extensión final	72 °C	120 seg.		72 °C	120 seg.	
Conservación	16 °C	infinito	-	16 °C	infinito	-

? **Digestión de los productos de PCR.** Para las digestiones, se emplearon tres enzimas de restricción, una para cada producto amplificado, así: producto con Primer I, se empleó la enzima de restricción CfoI; para el producto con Primer II la enzima MspI y para el producto con Primer IV, EcoRI. (Tabla 7).

Se empleo un formato para cada enzima, especificando las cantidades de los reactivos utilizados en las digestiones (Anexo L).

Tabla 7. Cantidades para el Mix de Digestión

Reactivos	Conc. Inicial	Conc. final	Volumen	
Agua	-	-	12.9	µl
Buffer de restricción	10 X	1X	2	µl
Enzima de restricción	200 U	1 U	0.1	µl
ADN amplificado	-	-	5	µl
TOTAL			20	µl

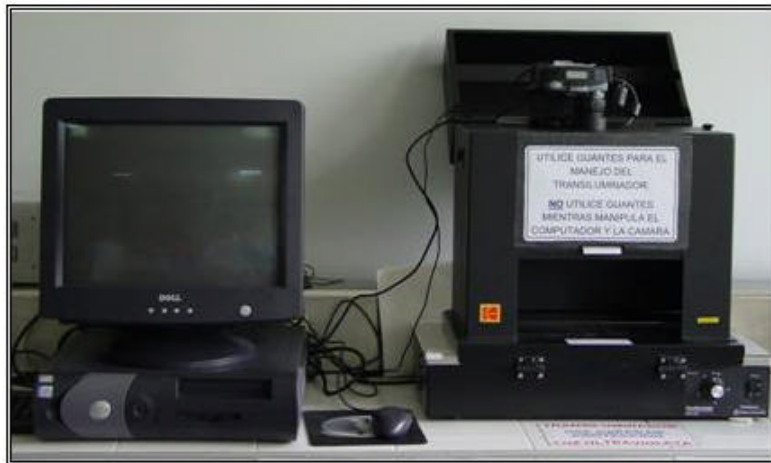
Tabla 8. Condiciones para las Digestiones

ENZIMA	CfoI		MspI EcoRI	
Nombre del Programa	CfoI		MspI	EcoRI
Propósito	Temp.	Tiempo	Temp.	Tiempo
Actividad de la enzima	37 °C	4 horas	37 °C	4 horas
Inactividad de la enzima	80 °C	15 min.	65 °C	15 min.
Conservación	16 °C	infinito	16 °C	Infinito

? **Electroforesis**

? **Electroforesis en gel de azarosa.** La digestión de las muestras fueron servidas en un gel de agarosa al 2 % en TBE1X (con 2 µg/ml de Bromuro de Etidio). El gel se corrió por 4 horas a 60 voltios (CIP, 2000). Los patrones de restricción se visualizaron en un sistema de documentación (Adobe Fotoshop versión 7.0) el cual permitió registrar las fotografías de los geles de agarosa mediante el trasiluminador, la cámara Kodak y el sistema computacional.

Figura 12. Sistema de fotodocumentación para geles de agarosa.



4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 FASE DE CAMPO

4.1.1 Área de estudio. La localización de cultivos afectados por la enfermedad se realizó entre marzo del 2003 y abril del 2004, paralelamente se llevaron a cabo las técnicas de aislamiento y mantenimiento del cepario de *P. infestans*.

Las quince zonas de los departamentos de Nariño y Putumayo (Tabla 9) donde se hizo la colecta fueron escogidos gracias a comunicaciones verbales con pobladores de dichas localidades quienes informaron acerca de la presencia de cultivos de Tomate de árbol y de mesa infectados por el patógeno en estudio.

Tabla 9. Procedencia hospedante y local de *P. infestans*

Hospedero	Zonas de Muestreo
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Genoy (Corregimiento de Pasto)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Tangua (Municipio de Nariño)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	San Juan (Corregimiento de Ipiales)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Ipiales (Municipio de Nariño)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Obonuco (Corregimiento de Pasto)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Catambuco (Corregimiento de Pasto)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Buesaco (Municipio de Nariño)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Funes (Municipio de Nariño)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	La Vega (Corregimiento San Bernardo)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	San Bernardo (Municipio de Nariño)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Sibundoy (Municipio de Putumayo)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Colon (Municipio de Putumayo)
Tomate de árbol (<i>Solanum betaceum</i>)	Consacá (Municipio de Nariño)
Tomate de Mesa (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Sibundoy (Municipio de Putumayo)
Tomate de Mesa (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	La Vega (Corregimiento San Bernardo)
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	Pasto (Municipio de Nariño)

4.1.2 Colección de muestras infectadas. En el proceso de colección de muestras infectadas en el campo, se comparó la sintomatología reportada teóricamente con la que se presentó en el campo en los cultivos de *S. betaceum* (Tomate de árbol) y *L. esculentum* (Tomate de mesa). La dificultad en la localización de los cultivos infectados, presencia de cultivos en invernadero, lo cual disminuye el riesgo de infección y la temporada de verano, impidieron el desarrollo de la enfermedad y retardaron el proceso de colección.

4.2 FASE DE LABORATORIO

4.2.1 Aislamiento de *P. infestans*. Los aislamientos evaluados fueron colectados a partir de cultivos de tomate de árbol y tomate de mesa, en 15 zonas correspondientes a los departamentos de Nariño y Putumayo (Figura 3 y 4) (Tabla 3). Se reactivó un aislamiento de *P. infestans* procedente de papa (*Solanum tuberosum*) Lagos⁷⁰, el cual fue incluido en el presente estudio como control.

El número de muestras y la facilidad para aislar *P. infestans* fueron factores relativos y proporcionales en el transcurso de la investigación; pues lograr la adaptación del fitopatógeno a las condiciones de laboratorio demandaron:

✍ Un ambiente aséptico pues el cultivo del patógeno es muy sensible a cualquier riesgo de contaminación es por eso que en los aislamientos primarios del patógeno, se vio la necesidad de suplementar el V8 con diferentes concentraciones de antibióticos (Ampicilina, Rifampicina, Nistatina) y fungicida (Benlate), con el fin de inhibir el crecimiento de otros microorganismos como: bacterias, hongos (*Fusarium*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*) y levaduras.

✍ Exigencias nutricionales: fue necesario emplear diferentes medios de cultivo, para lograr un óptimo crecimiento de *P. infestans*; que variaron desde Agares convencionales como Agar Arveja, Agar Avena, PDA (Anexo E,Fy G), donde se experimentó diferentes concentraciones de azúcar, cantidades de arveja, diferentes infusiones de hojas sanas de tomate de árbol, donde se obtuvo escaso crecimiento del patógeno y en algunas ocasiones no se obtuvo nada. Finalmente, en reportes bibliográficos de Fry, se pudo confirmar que “El V8 100 % Vegetable Juice, un suplemento energético importado compuesto de jugo de tomate, jugo de vegetales (zanahoria, apio, espinaca, perejil), agua y vitamina C, fue la materia prima para acoplar las condiciones necesarias del crecimiento del fitopatógeno”⁷¹.

✍ Temperatura de incubación controlada (12 – 15 °C, de diez a quince días)

✍ Constante revisión macroscópica (presencia de colonias algodonosas de color blanquecino) y microscópica (permitió la observación de hifas aceptadas o cenocíticas, hialinas, esporangióforos solitarios o numerosos y esporangios en forma de limón) (Figuras 13 y 14)

✍ Persistencia en la multiplicación del micelio en los medios de cultivo

⁷⁰ LAGOS., Op cit., p 35

⁷¹ FRY, Op cit., p 1

Los anteriores factores son motivo de peso para justificar la limitación en el número de los aislamientos de *L. esculentum* (Tomate de mesa), sin embargo no se puede descartar el empleo de nuevas metodologías propias para este y otros hospederos como *Solanum quitoense* (Lulo) y otras especies silvestres.

Figura 13. Cultivo de micelio de *P. infestans* creciendo en medio V8

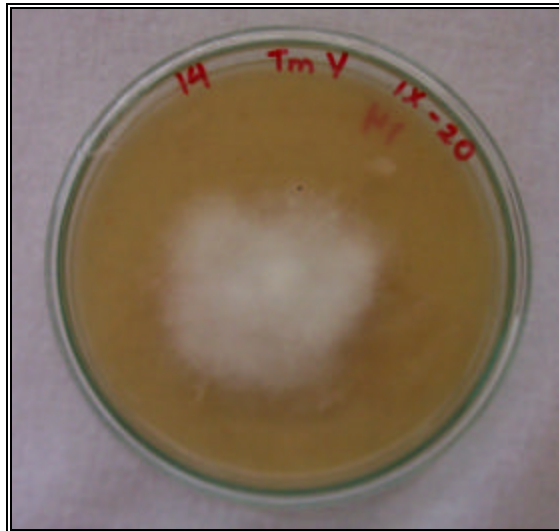


Figura 14. Microfotografía de *P. infestans* indicando el esporangio y el esporangioforo



Una vez realizada la identificación macro y microscópica de *P. infestans* se observó el crecimiento del patógeno en los siguientes medios:

Agar V8 Mix: Permitió el desarrollo progresivo de colonias de color blanco, con crecimiento escaso. El crecimiento se manifestó de los 8 - 10 días después de la siembra. Cabe anotar que las concentraciones de los antibióticos y fungicida, retrasaron el crecimiento del patógeno.

Agar V8: Permitió la purificación del patógeno, una colonia blanquecina, con crecimiento moderado, el cual se presentó al cabo de 3 - 8 días después de la siembra.

Caldo arveja: útil para la multiplicación del micelio de *P. infestans*, permitió el desarrollo de una colonia blanquecina flotante con crecimiento abundante que se expandió sobre toda la superficie y la profundidad del medio. El crecimiento se manifestó de 3 - 10 días después de la siembra.

4.2.2 Mantenimiento de la colección de *P. infestans*. El cepario de *P. infestans* aislado de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum*) y papa (*Solanum tuberosum*), procedentes de los departamentos de Nariño y Putumayo, se mantienen en los Laboratorios de Microbiología de la UDENAR, con duplicados en los Laboratorios de Biología Molecular de la UNAL PALMIRA y MEDELLÍN.

4.2.3 Manejo de técnicas moleculares: PCR – RFLP's. Esta parte del estudio se desarrolló entre junio y agosto del 2004 en el laboratorio de Biología Molecular de la UDENAR y de septiembre a noviembre del mismo año en el Laboratorio de Biología Molecular de la UNAL PALMIRA.

? **Extracción de ADN.** Con el empleo de la metodología propuesta por Afanador *et al.*, 1993, se obtuvo un ADN degradado, por tal motivo se modificó este protocolo, obviando unos pasos que hacen referencia a la purificación del ADN, sin afectar el proceso de extracción. El ADN extraído se resuspendió en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 80 ul de Buffer TE 1X, y se almacenó en nevera hasta su posterior análisis.

? **Evaluación del genoma mitocondrial.** Se empleó la metodología de PCR-RFLP's para la evaluación de los haplotipos mitocondriales del patógeno utilizando los juegos de cebadores P1, P2 y P4 (sus secuencias se presentan en la (Tabla 4) los cuales permitieron amplificar fragmentos del tamaño esperado de 1118, 1070 y 964 bp respectivamente (Figuras. 15, 16 y 17).

Figura 15. Amplificación con Primer (F1-R1) que indica un fragmento de 1118 bp, ■ *Solanum betaceum*, ■ *Lycopersicon esculentum* y ■ *Solanum tuberosum*

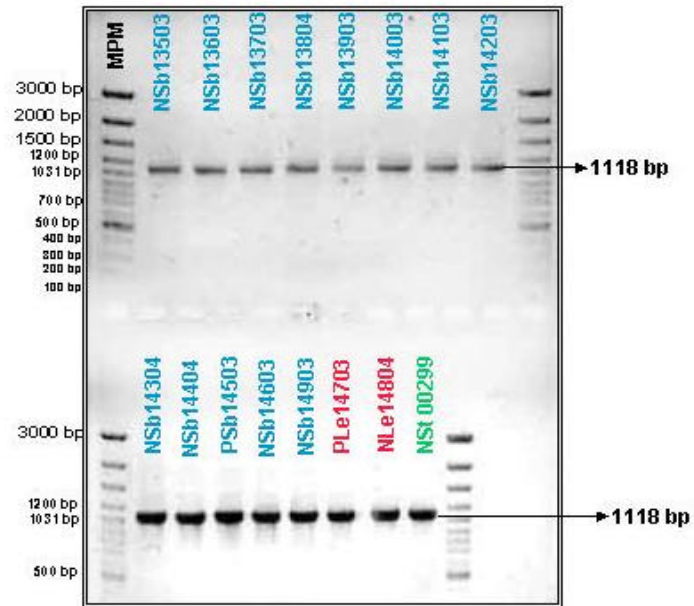


Figura 16. Amplificación con Primer (F2-R2) que indica un fragmento de 1070 bp, ■ *Solanum betaceum*, ■ *Lycopersicon esculentum* y ■ *Solanum tuberosum*

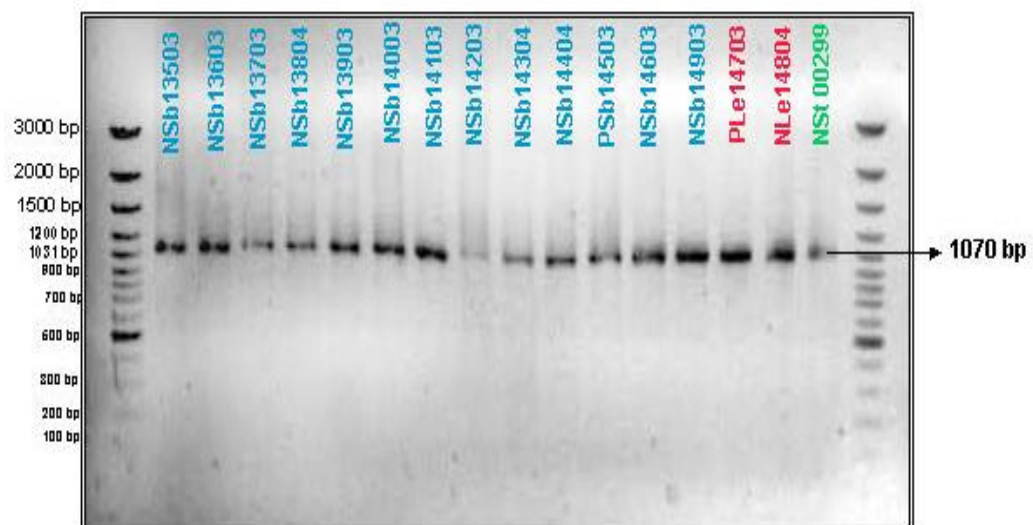
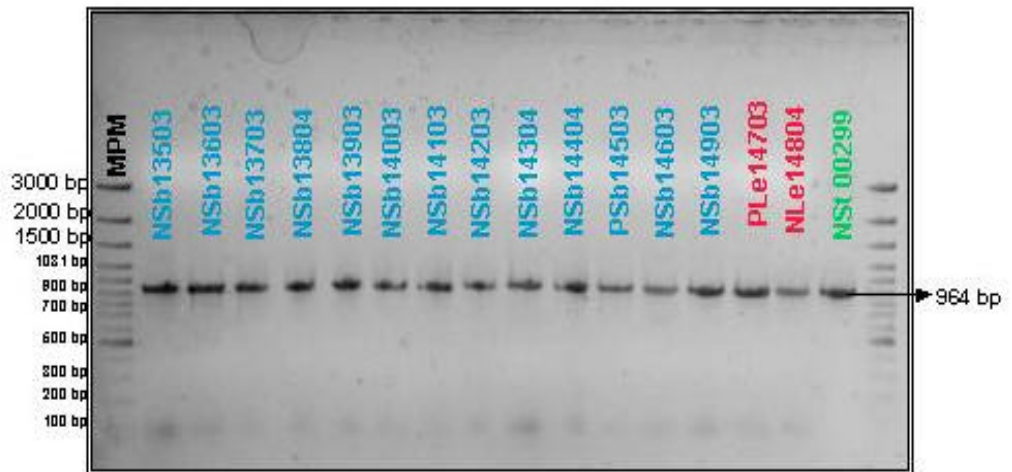


Figura 17. Amplificación con Primer (F4-R4) que indica un fragmento de 964 bp ■ *Solanum betaceum*, ■ *Lycopersicon esculentum* y ■ *Solanum tuberosum*



Las Figuras 18, 19 y 20 muestran los patrones electroforéticos claramente distinguibles, después de incubar los amplificados P1, P2 y P4 con las enzimas de restricción CfoI (sitio de reconocimiento: GCG C), MspI (sitio de reconocimiento: C CGG) y EcoRI (sitio de reconocimiento G AATTC) respectivamente para cada par de cebadores.

El producto del corte P1 con CfoI identificó los haplotipos Ia, Ib y IIb, mientras los haplotipos Ia y IIb fueron diferenciados por la digestión del producto P2 y MspI. Las digestiones del producto P4 con EcoRI reconoció los haplotipos Ia y Ib para *S. betaceum*. En el caso de *L. esculentum* y *S. tuberosum* se encontró los haplotipos IIa para los productos de P1 y P2 digeridos con CfoI y MspI respectivamente; en tanto que la digestión del producto P4 con EcoRI mostró los haplotipos IIa y IIb. (Tabla 10).

Figura 18. Haplotipos mitocondriales de *P.infestans*. Evaluación con el primer 1 y Cfol. La flecha indica la posición de las bandas de los fragmentos digeridos. De izquierda a derecha: Marcador de Peso Molecular de 100 bp (promega), ■ Fragmento digerido (Ia) ■ y ■ Fragmentos no digeridos (IIa)

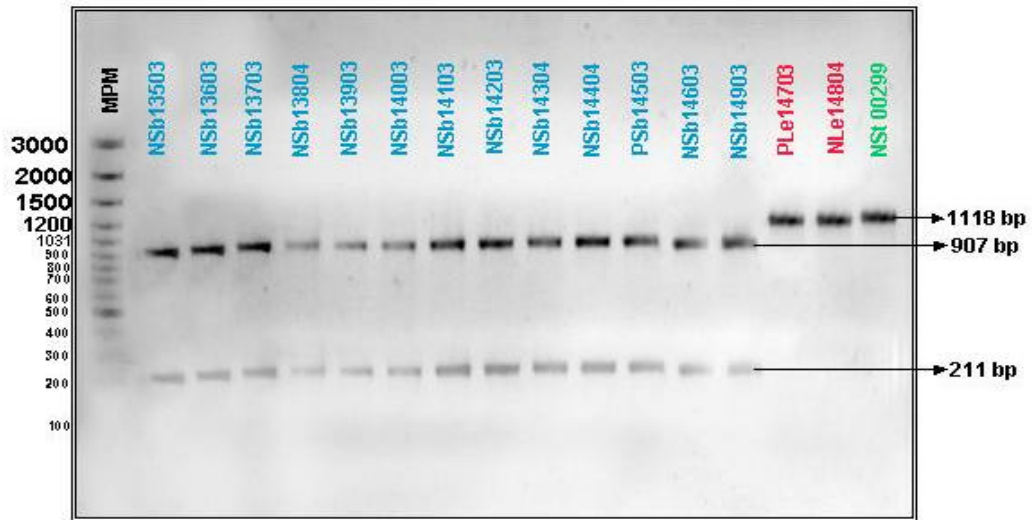


Figura 19. Haplotipos Mitocondriales de *P.infestans*, Evaluación con el Primer 2 y MspI. La flecha indica la posición y el peso de las bandas de los fragmentos digeridos. De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular de 100bp (promega) y los fragmentos digeridos: ■ Haplotipo Mitocondrial (Ia) ■ y ■ Haplotipo Mitocondrial (IIa)

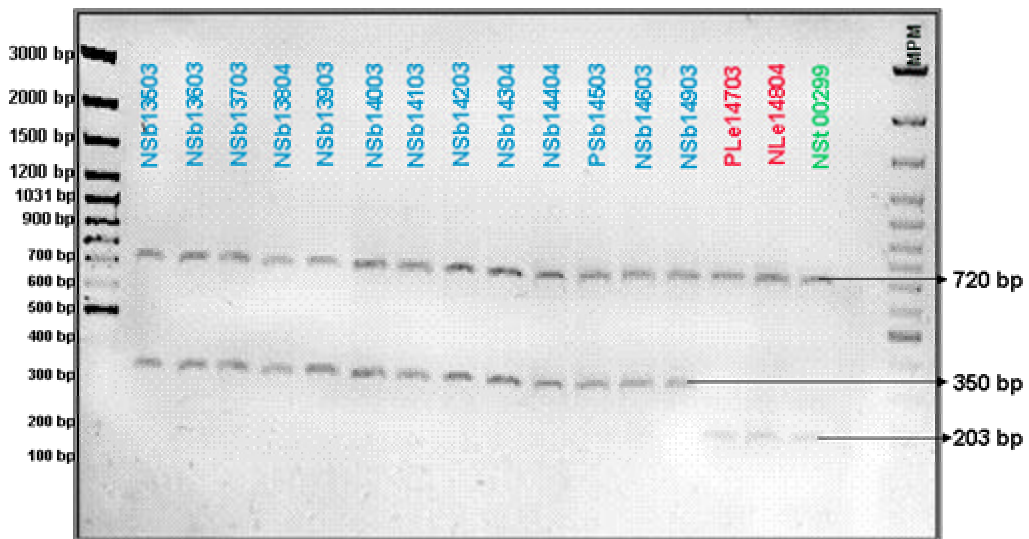


Figura 20. Haplotipos Mitocondriales de *P.infestans*, Evaluación con el primer 4y EcoRI. La flecha indica la posición y el peso de las bandas y de los fragmentos digeridos. De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular de 100bp (promega). Fragmentos digeridos: ■ Haplotipo mitocondrial (Ia); ■ y ■ Haplotipo mitocondrial (IIa)

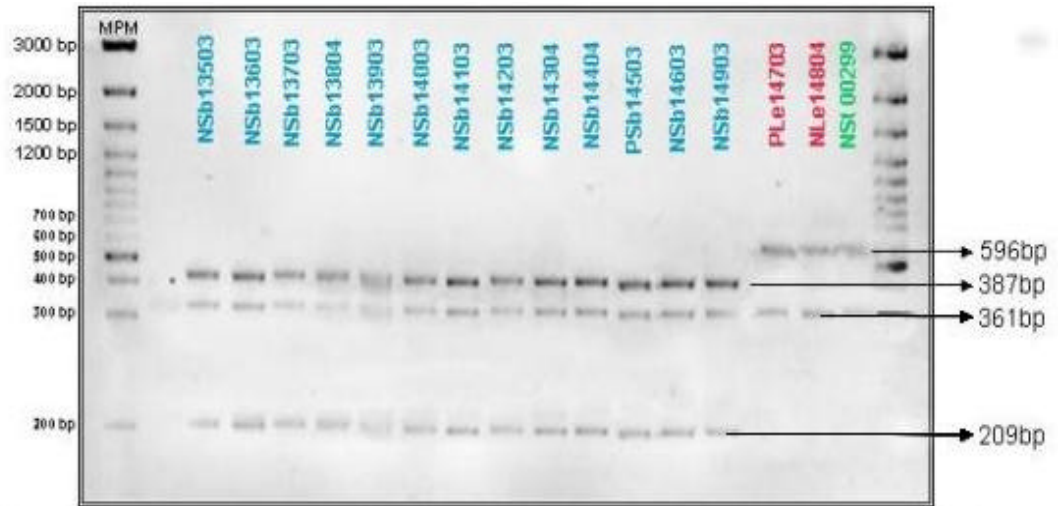


Tabla 10. Haplotipos Mitocondriales de *Phytophthora infestans*

No. muestra	Hospedero	Zona de muestreo	Cfol				MspI				EcoRI				Haplotipo Mitocondrial	Posible Linaje clonal
			la	lb	Ila	IIb	la	lb	Ila	IIb	la	lb	Ila	IIb		
1	NSb 13503	Tomate de Árbol	Genoy	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
2	NSb 13603	Tomate de Árbol	Tangua	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
3	NSb 13703	Tomate de Árbol	San Juan	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
4	NSb 13804	Tomate de Árbol	Ipiales	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
5	NSb 13903	Tomate de Árbol	Obonuco	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
6	NSb 14003	Tomate de Árbol	Catambuco	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
7	NSb 14103	Tomate de Árbol	Buesaco	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
8	NSb 14203	Tomate de Árbol	Funes	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
9	NSb 14304	Tomate de Árbol	La Vega	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
10	NSb 14404	Tomate de Árbol	S.Bernardo	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
11	PSb 14503	Tomate de Árbol	Sibundoy	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
12	PSb 14603	Tomate de Árbol	Colon	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
13	NSb 14903	Tomate de Árbol	Consacá	x	x	x		x		x		x	x		la	EC-3
14	PLe 14703	Tomate de Mesa	Sibundoy			x				x			x	x	Ila	EC-1
15	NLe14804	Tomate de Mesa	La Vega			x				x			x	x	Ila	EC-1
16	NSt 00299	Papa	Pasto			x				x			x	x	Ila	EC-1

“Los aislados provenientes de *Solanum betaceum* (tomate de árbol) exhiben el haplotipo mitocondrial Ia, mientras que los provenientes de *Lycopersicon esculentum* (tomate de mesa) y *Solanum tuberosum* (papa) muestran el haplotipo mitocondrial IIa, predominante en todas las solanáceas de la sección petota”⁷²

Según Oyarzun *et al* “Los haplotipos mitocondriales reportados para *Solanum betaceum* en el Ecuador corresponden al linaje clonal EC-3, el cual posee el haplotipo mitocondrial”.⁷³,. Hasta el momento no existen reportes en Colombia de la caracterización de *Phytophthora infestans* asociado a tomate de árbol a excepción del presente trabajo. Los aislamientos obtenidos de *S. betaceum* de los departamentos de Nariño y Putumayo indican la presencia del mismo haplotipo mitocondrial (Ia) reportado en el Ecuador.

Abad argumenta que “Dada la cercanía geográfica y el flujo constante de material vegetativo entre estos dos países se asume que son una misma población y en consecuencia podrían pertenecer al linaje clonal EC-3”⁷⁴ No existe suficiente evidencia para afirmar que se trata de una migración desde el Ecuador hacia Colombia, ya que no existen caracterizaciones previas para los aislamientos de *S. betaceum*.

Erselius *et al.*, plantean que:

El linaje clonal EC-3 es bastante similar a EC-2, patógeno de *S. brevifolium* y *S. tetrapetalum*. Ambos comparten tres nuevas bandas RFLP y el genotipo poco usual Pep 76/100. EC-3 también posee el alelo Gpi 86/100, el cual se encuentra asociado con el linaje clonal US-1 y otros similares a el, que también han sido encontrados en México. La hipótesis propuesta por Erselius *et al.*, discute que hubo una migración desde México, en una época y bajo un mecanismo no determinados.

Los resultados de experimentos de inoculación cruzada demuestran de manera general, que cada linaje clonal está asociado con más de un hospedero, pero rara vez los hospederos están asociados con más de un linaje clonal. La excepción es el linaje clonal EC-3, que es el único encontrado en *Solanum betaceum*, y del que no existe reporte alguno de ser capaz de infectar a otros hospederos⁷⁵.

⁷² ABAD, Op.cit., p. 12

⁷³ OYARZUN, P. et. al., Op.cit., p. 45

⁷⁴ ABAD, Op.cit., p. 12

⁷⁵ ERSELIUS, L., J. Genetic Diversity among Isolates of *Phytophthora infestans* from Various Hosts in Ecuador. USA : CIP Program Report, 1997-1998. p. 58

Erselius *et al.*, afirma que: En *Lycopersicon esculentum*, los reportes indican la presencia dominante del haplotipo mitocondrial Ib correspondiente al linaje clonal antiguo US-1 encontrado actualmente en Colombia y Ecuador. Sin embargo, también se ha reportado el linaje clonal EC-1 con un haplotipo mitocondrial IIa, el cual es más frecuente en papa⁷⁶. Coincidiendo con esta última afirmación, en el presente estudio la evaluación de dos muestras del patógeno aislado de *L. esculentum* de Nariño y Putumayo presentaron este haplotipo (IIa).

Erselius *et al.*, afirma que: “Se ha demostrado que la papa y el tomate son atacados por poblaciones separadas del patógeno cuando existe una barrera geográfica tal como ocurre en la zona Andina en donde se cultivan en ecosistemas diferentes. Sin embargo en algunas regiones de transición, donde se cultiva papa y tomate, estos cultivos son atacados por una única población del patógeno, lo cual indica que un solo linaje clonal puede infectar diferentes especies⁷⁷ Este sería el caso para las regiones de Nariño y Putumayo.

Además, también debe considerarse la hipótesis de Forbes: “del desplazamiento del linaje clonal US-1 por el linaje clonal EC-1 en los cultivos de papa, siendo este último mucho más agresivo y resistente al Metalaxyl. Es probable que esta situación también esté ocurriendo en los cultivos de tomate en estas regiones. Un muestreo intensivo de los cultivos de tomate de las regiones permitiría determinar el grado de este posible desplazamiento⁷⁸.

Según Erselius *et al.*, “La determinación de haplotipos mitocondriales de *P. infestans* en Nariño sugiere una estructura poblacional clonal, existiendo solo dos haplotipos mitocondriales, Ia y IIa, correspondientes a los linajes clonales EC-3 y EC-1 respectivamente⁷⁹. Como dice Lagos⁸⁰ de estos, el tipo Ia es el haplotipo exclusivo en tomate de árbol, y el haplotipo IIa es el dominante en papa y el único reportado en tomate.

El mismo autor afirma que: “Hasta el momento es posible afirmar que en Nariño el linaje clonal US-1 ha sido completamente desplazado de los cultivos de papa por el linaje clonal EC-1⁸¹; para el caso de *L. esculentum* (tomate de mesa), es necesario aumentar la cantidad de muestras de *P. infestans*, y de esta manera

⁷⁶ ERSELIUS, L., et. al. Stability in Population of *Phytophthora infestans* Attacking Tomato in Ecuador Demonstrated by Cellulose Acetate Assesment of Glucose 6-P Isomerase. En: Plant disease. Vol. 84, No. 3 (2000); p. 325-327.

⁷⁷ Ibid., p. 327

⁷⁸ FORBES, Op.cit., p. 380

⁷⁹ ERSELIUS, L., J. Genetic Diversity among Isolates of *Phytophthora infestans* from Various Hosts in Ecuador

⁸⁰ LAGOS, Op.cit., p. 25

⁸¹ Ibid., p. 25

confirmar el desplazamiento del antiguo linaje clonal (US-1) por el nuevo (EC-1). De ser necesario se debe hacer la extracción de ADN directamente a partir de lesiones foliares, dada las dificultades de aislamiento del patógeno.

En la Tabla 11, es posible observar como el linaje clonal US-1 aun persiste en los cultivos de tomate en la zona norte de Colombia. De continuar con la tendencia de desplazamiento del linaje clonal US-1 por EC-1, éste tendera a desaparecer en las pocas regiones del país en las que aun existe US-1.

Tabla 11. Diversidad de *P. Infestans* en Solanáceas en Colombia

Procedencia	Hospedero	Haplotipo Mitochondrial	Posible Linaje Clonal
Nariño y Putumayo	<i>Solanum betaceum</i>	Ia	EC-3
Nariño y Putumayo	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Ila	EC-1
Nariño ⁸²	<i>Solanum tuberosum</i>	Ila	EC-1
Antioquia y Norte de Santander ⁸³	<i>Solanum tuberosum</i>	Ila	EC-1
Antioquia y Norte de Santander	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Ib	US-1
Cundinamarca y Boyacá	<i>S. tuberosum, S. muricatum</i> <i>L. esculentum</i>	Ila	EC-1

⁸² Ibid., p. 25

⁸³ JARAMILLO, Op.cit., p. 48

5. CONCLUSIONES

? La presencia del nuevo haplotipo mitocondrial la fue exclusivo para todos los aislamientos procedentes de *S. betaceum* y mostraron la homogeneidad de las poblaciones de *P. infestans* estudiadas. Esto permite confirmar la presencia de un nuevo posible linaje clonal como lo es el EC-3, encontrado previamente en Ecuador. En tanto que *Lycopersicon esculentum* presentó un haplotipo IIa el cual corresponde antiguo linaje clonal US-1.

? Conocer la estructura de la población de *P. infestans* procedente de papa y tomate puede servir para modificar las estrategias de manejo de la enfermedad. En este caso sería de vital importancia descartar la tendencia del patógeno a aumentar su virulencia, al estar siendo desplazada la población US-1, menos virulenta y susceptible al Metalaxyl, por la determinada como posible EC-1, más virulenta, resistente al fungicida y capaz de infectar más variedad de hospederos.

6. RECOMENDACIONES

- ? Se deben emplear marcadores fenotípicos, como tipo de apareamiento y sensibilidad a fungicidas, así como también genotípicos, como isoenzimas (Glucosa 6-fosfato isomerasa y Peptidasa), que permitan la confirmación del linaje clonal.
- ? Para confirmar los haplotipos de *P. infestans* predominantes en los huéspedes es necesario un muestreo intensivo. En algunos casos puede llegar a ser necesaria la extracción de ADN directamente a partir de las lesiones, sin necesidad del cultivo del patógeno.
- ? Para hacer un control eficiente de la gota, debe establecerse un sistema de alerta mediante una periódica caracterización del patógeno, en las zonas donde existan cultivos de papa, tomates y otras solanáceas hospederas; además se deben incluir las solanáceas silvestres, para entender la dinámica evolutiva y evidenciar los posibles cambios genéticos en la población; todo esto con el fin de conocer de manera oportuna las condiciones favorables para el desarrollo de futuras epidemias.

BIBLIOGRAFÍA

ABAD, Z.G., ABAD, J.A. and OCHOA, C. Fernández-Northcote. Additional Evidences that Support the Andes of South at Center of origin of *Phytophthora infestans*. En: GILB'02 Conference Late Blight: Managing The Global Threat. Hamburg, Germany. ABSTRACTS. (july, 2002); p.12-13.

ABAD, Z. G y ABAD, J. A. Historical evidence on the ocurrence of late blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. En: *Phytophthora infestans* 150. ABSTRACTS Germany : s.n., 1995 p. 36

ABAD, Z. G . *Phytophthora infestans* en la zona Central del Perú: Razas, Patotipos, Especialización Fisiológica, Tipos de compatibilidad, Resistencia de variedad y Rangos de hospederos. Lima – Perú, 1983, p. 62. Tesis M.Sc. (M.Sc. en Agronomía). Universidad Nacional Agraria La Molina. Programa Académico de Graduados.

AFANADOR, L., GILCHRIST, E., MARIN, M., PATIÑO, L.F., JARAMILLO, S., LOPEZ, J., y MARQUEZ, M. Avances sobre el estudio de la estructura poblacional del hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, en Colombia. En: CONGRESO DE FITOPATOLOGIA Y CIENCIA AFINES. Memorias del XIX Congreso de Fitopatología y Ciencias afines – ASCOLFI. Salud Pública Vegetal. Pasto. (1998); p. 180.

AFANADOR L.; HALEY, S.D. and KELLY, J.D. Adoptions of –Mini-press- DNA straction Method for RAPD Marker Análisis in Común Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) En: Annual Report of the Bean Improvement Coopertative. Vol. 36. (1993); p. 10-11.

AGRIOS, G. Fitopatología. México. Limusa. 1996. p, 303

ALDER, N., CHACON, M.G., FORBES, G.A., and FLIER, W.G. *Phytophthora infestans* Censu Lato in South America Population Substructuring through Host-specificity. Late blight managing the Global threat. Proceeding of the Global Initiative on Late blight Conference. Hamburg, Germany : Lizárraga, 2002 p. 13-17.

ANDRIVON, D. Biology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. En : In soil. Mini Rev. Vol. 85, (1995), p. 1053

BENAVIDES, D. y MONCAYO, B. Caracterización aloenzimática de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Departamento de Nariño. Tesis pregrado.

Facultad de Ciencia Naturales y Matemáticas. Programa de Biología. Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. (2002).92 p

BOTERO H. y GILCHRIST, E. Evaluación en la compatibilidad de diferentes aislamientos del hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary con algunas especies de la familia Solanaceae. Trabajo de Grado (Ingeniería Agronómica). Facultad de Ciencias Agrícolas. Medellín. (1997).

CALDERON, H. J. y CASTRO M. Estructura Poblacional del fitopatógeno *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en los departamentos de Boyaca y Cundinamarca. Medellín, 2002 p. 31. Tesis pregrado. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias exactas y Naturales. Instituto de Biología.

CARTER, D. A., ARCHER, S.A., BUCK, K.W., SHAW, D.S., and SHATTOCK, R.C. DNA polymorphisms in *Phytophthora infestans*: the UK experience. En: *Phytophthora*. Cambridge University Press, Cambridge. (1991); p, 272 – 294.

_____ DNA Polymorfism as genetic markers in *Phytophthora infestans*. PhD Tesis. University of London, UK. (1990).

CARTER, D.A, ARCHER, S.A., and BUCK, K.W. Restriction fragment polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. En: *Mycological Research*. London Vol. 94, No. 8 (1990); p. 1123 – 1128.

CASTAÑO, Jairo. Manejo del tizón tardío de la papa: estado actual. En : *Papas Colombianas. Con el mejor entorno ambiental. Resúmenes*. Santa fe de Bogotá : s.n.,1996 p. 95

CAVELIER, SMITH, T. The kingdom Chromista: origen an systematics. En : *Progress in Phycologia Research*. Biopress, Bristol, England : J. Roed & D. J. Chapman, 1986, p. 309

CHACON, G., ALDER, N., GESSLER, C., FLIER, W. and FORBES, G.A. Characterization of *Phytophthora infestans* on Wild and Cultivated Solanaceas in Ecuador. En: GILB'02. CONFERENCE: Late blight managing the Global threat. Hamburg, Germany. ABSTRACS. (July, 2002); p. 11

CIP. Manual curso “Uso de Marcadores Moleculares en la Caracterización de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary” *Molecular Plant Pathology*. Centro Internacional de la Papa. Lima. Perú : CIP, 2000. p. 48

DEACON, J. Introducción a la Micología moderna. Mexico : Limusa. 1990, p. 85

DRENTH, et al. Formation and survival of spores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. En : *Plant Pathology*. Vol. 44 (1995), p. 86.

ERSELIUS, L., J., VEGA-SANCHEZ, M.E., and FORBES, G. Estability in Population of *Phytophthora infestans* Attacking Tomato in Ecuador Demostrated by Cellulose Acetate Assesment of Glucose 6-P Isomerase. En: Plant disease. Vol. 84, No. 3 (2000); p.327.

ERSELIUS, L., J. Genetic Diversity among Isolates of *Phytophthora infestans* from Various Hosts in Ecuador. CIP Program Report. 1997-1998

ERWIN, D. C y RIBEIRO. O.K. *Phytophthora* Diseases worldwide. APS. Minesota : Press the American Phythopatological society. St Paul, 1996 p. 562

FORBES, G.A., ESCOBAR, X.C., AYALA, C.C., REVELO, J., ORDOÑEZ, M.E., FRY, B.A., DOUCETT, K. and FRY, W.E. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. En: Phytopathology. Ecuador. Vol. 87, No. 4 (1997); p. 375

FRY, W.E. "On – line manual for *P.infestans* laboratory work". Fry's. Dr. Shaw's Laboratory in Bangor, G. B., and in the laboratory of Dr. W. Flyer in Wageningen. U.S.A. : Laboratory in Cornell, 2001. p. 5

FRY, W.E., GOODWIN, S.B, DYER, A.T., MATUZSAK, J.M., DRENTH, A., TOOLEY, P.W., SUJKOWSKY, L.S., KOOH, Y.J., COHEN, B.A., SPIELMANL, L.J., INGLIS, D.A. and SANDLAN, K.P. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways and implications. En: Plant Diseases. Vol. 77, No. 7 (1993); p. 653 – 661.

GILCHRIST, E. Evaluación de diversidad genética y patogénica del hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en Antioquía. Tesis M.Sc Universidad Nacional de Medellín. (2001).

GOODGWIN, S.B. The Population Genetics of *Phytophthora*. En: Phytopathology. USA. Vol. 87, No. 4 (Abril, 1997); p. 462

_____ DNA polymorphisms in *Phytophthora infestans*: the Cornell experience. En: *Phytophthora*. Symposium of the British Mycological Society, The British Society for Plant Pathologist and the Society of irish Plant Pathologists. Cambridge University Press. USA. Cap. 17 (September, 1989); p. 271.

GONZÁLEZ, G. P. y GARCIA, C. Caracterización de las poblaciones de *Phytophthora infestans* con base en el tipo de apareamiento y sensibilidad al fungicida Metalaxyl en el altiplano cundiboyacense. Tesis M. Sc. . Universidad Nacional de Colombia. Sede Santafé de Bogotá. Facultad de Ciencias Agrícolas. (1997).

GRAHAM, K. M., NIEDERHAUSER, J. S. and ROMERO, S. Observation on races of *Phytophthora infestans* in Mexico during 1956 – 1957. Mexico. Vol. 36 (1959); p. 203.

GRIFFITH, G. W. and SHAW, D. S. Polymorphisms in *Phytophthora infestans* four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol. 64. No. 10. (1998); p. 4007 – 4014.

GUALTERO, C. E. Caracterización aloenzimática de poblaciones de *Phytophthora infestans* en papa en el altiplano cundiboyacense de los Andes de Colombia. Tesis M. Sc. Universidad Nacional de Colombia. Sede Santafé de Bogotá. Facultad de Ciencias Agrícolas. (1997).

HENFLING, J. W. El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. Lima – Peru. Boletín de Información técnica CIP. No. 4. (1987); p 9.

JARAMILLO, S. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Medellín, 2003. p. 38. Monografía de grado (Biologo). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

JARAMILLO, V.S., AFANADOR, L., MARQUEZ, E.J., LOPEZ, J.B., ARANGO, R. y ZAPATA, J.L. Caracterización genética del patosistema *Phytophthora infestans* / *Solanum tuberosum* y su relación con polimorfismos moleculares. Proyecto Universidad Nacional (Medellín) – COLCIENCIAS. (1998).

JUNCHAYA, G. *Phytophthora Infestans* en la Zona Central del Perú: Razas, Patotipos, especialización fisiológica, tipos de compatibilidad, resistencia de variedades y rango de hospedantes. Tesis m. Sc. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Peru. (1983); p. 151.

KAMOUN, S. Basic Biology: Information of mechanisms that make *Phytophthora infestans* a pathogen. En: GILB'02 Conference late blight: Managing the Global treath. Abstract. Hamburg, Germany. (July – 2002); p. 11-13.

KLIMCZAK, L.J., PRELL, H.H. Insolations and characterization of mitochondrial DNA of the oomycetous fungus *Phytophthora infestans*. *Curr-genet*. Berlin, W. Ger.: Springer International. Vol. 8, No. 4 (1984); p. 323-

MARIN, M. Y MIRA, J.J. Caracterización de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislamiento de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, en diferentes piso térmicos y hospederos en el Departamento de Antioquia. Medellín, 1998, p. 56. Tesis Pregrado. Universidad Nacional de Colombia.

MAZO, J. Y PATIÑO, L. Determinación de Razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislamientos de *Phytophthora infestans*. Tesis Pregrado. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. (1995).

MUÑOZ, J. E. y ENRIQUEZ, M. A. Técnicas multivariadas en el análisis datos sobre caracterización molecular. Palmira : Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira, 2003. p. 36

LAGOS, L. Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum* L.) en el Departamento de Nariño. Cali, 2002, p. 45. Tesis M. Sc. (MSc. En Agronomía). Universidad del Valle.

ORDOÑEZ, M.E. et. al. . A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans* attacks wild *Solanum* species in Ecuador. En: Phytopathology. Vol. 90 (2000); p. 197 – 202.

OYARZUN, P. J., POZO, A., ORDOÑEZ, M.E. DOUCET, K. and FORBES, G.A. Host especificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. En: Phytopathology. Vol. 88, No. 3 (1998); p. 265

PATIÑO, L. J., MORALES, J.G., BURITICA, P., ZAPATA, J.L. y JARAMILLO, S. Comportamiento ecológico y poblacional de la interacción de *Phytophthora infestans* con diferentes Solanáceas. En: Fitopatología Colombiana. Vol. 22, No. 2 (1997); p. 54

QUINTERO, G., O.D. y SALDARRIAGA, M., G.M. Determinación del cariotipo de *Phytophthora infestans* mediante electroforesis de campo pulsado. Tesis Pregrado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. (1998).

RAVEN, P.H., EVERT, R. F. and EICHHORN, S. E. Biology of Plant. 6 Ed. New York : WH Freeman and Company. 1999. p. 370.

RIVERA - PEÑA, A. Racial composition a population of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Toluca Valley and slopes of the Volcano Nevado de Toluca the period 1989 – 1994 . En: *Phytophthora infestans* 150. Mexico : s.n., 1995 p. 116

ROBERTSON, N. F...The challenge of *Phytophthora infestans*. En : Advances in Plant Pathology. London. Vol. 7 (1991), p. 130

SANCHEZ, C. D., Y MORALES, O. Caracterización de aislamientos monozoospóricos de *Phytophthora infestans* por análisis de zimodemas. Tesis

Pregrado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. (1996).

SHATTOCK, et al. Genetics, of *Phytophthora infestans* : Determination of recombination, segregation and selfing by isozime análisis. En : Phytopathology. Vol. 76 No. 4 (1986), p. 410

SHAW. The cytogenetics and Genetics of *Phytophthora infestans*. P. 81 – 94. En: *Phytophthora* its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. St Paul: American Pathology Society, 1983. p. 155

_____ The cytogenetics and Genetics of *Phytophthora infestans*. P. 81 – 94. En: *Phytophthora* its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. St Paul: American Pathology Society. (1983); p. 392.

SOZLY, D and STAUV, T. accuracy of methods to monitor sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamide fungicides. En : Compendium of potato diseases. St Paul, Minnesota : s.n., 1990. p. 40

THURSTON, H.D. and SCHULTZ, O. Late bligh. En: Compendium of potato diseases. St Paul, Minnesota : s.n., 1990, p. 40

TOOLEY, P. W.; FRY, W. E. and VILLAREAL G., M. Isozime caracterizacion of sexual and asexual *Phytophthora infestans* population. En: Phytopathology. Vol. 76 (1985); p. 435.

WANG, X. R.; SZMIDT, A. E. Molecular markers in population genetics of pathogen fungi. Departament of forest genetics and Plant Physiology. [en línea]. Swedish University of Agricultural Science. 1999 [citado Ago. 2004]. disponible en Internet : <URL :<http://kimura.genfys.sle.se/pgen/abstrac/xrwbook98htm>>

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A. Registro de colección

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE *PHYTOPHTHORA*
INFESTANS AISLADAS DE TOMATE DE ÁRBOL Y TOMATE DE MESA EN LOS
DEPARTAMENTOS DE NARIÑO Y PUTUMAYO

REGISTRO DE COLECCIONES

FECHA: _____ No. Colección: _____
Municipio: _____ Vereda: _____
Altura: _____ Temperatura: _____
Agricultor: _____
Tipo de planta: _____ Variedad: _____
Fecha de Siembra: _____
Fecha de aparición primeros síntomas: _____
Fecha de colecciones: _____

Productos químicos aplicados:

Nombre: _____ Fecha: _____
Nombre: _____ Fecha: _____
Observaciones: _____

Anexo B. AGAR V8 MIX (Antibiótico y Fungicida)

MIX: 1.5 g Ampicilina

0.15 g Rifampicina

0.375 g Nistatina o Micostatin

0.72 g Benlate

Llevar a 50 ml de DMSO previamente esterilizado

Agregar 1 ml de Mix a 1litro esterilizado de Agar V8. Servir en cajas de petri estériles.

Anexo C. Agar - V8

1.5 g Carbonato de calcio

18 g Agar Bacteriológico

15 g Azúcar

150 ml Jugo V8

Llevar a 1 litro con agua destilada, esterilizar y servir el medio.

Anexo D. Caldo Arveja

40 g de arveja seca

30 g Azúcar o sacarosa

Cocer las arvejas por 20 minutos, filtrar y llevar a 1litro con agua destilada, esterilizar y servir el medio.

Anexo E. Agar Arveja

18 g Agar Bacteriológico

30 g Azúcar o sacarosa

40 g de arveja seca

Dejar hervir las arvejas por 40 minutos, filtrar y llevar a 1litro con agua destilada, esterilizar y servir el medio.

Anexo F. Agar Avena

12 g Agar Bacteriológico

20 g Azúcar o sacarosa

30 g de avena

Cocer la avena durante 15 minutos, filtrar y llevar a 1litro con agua Destilada, esterilizar y servir el medio.

Anexo G. PDA

Disolver 39 gramos de PDA en un litro de agua destilada. Autoclavar, enfriar y servir en cajas de petri o tubos.

Anexo H. Protocolo para extracción de ADN de *P. infestans*

1. Macerar 100 mg de micelio con Nitrógeno líquido
2. precalentar el buffer de extracción (Buffer CTAB 2X) a 65°C
3. Tomar 400 uL de buffer de extracción CTAB 2X
4. Agregar 4 uL de B-mercaptoetanol
5. Mezclar en Vortex
6. Incubar a 65°C en baño Maria durante 30 minutos, mezclando por inversión cada 5 minutos
7. Extracción con cloroformo – alcohol isoamilico 24:1, así:
 - ✍ Agregar 400 uL de cloroformo – alcohol isoamilico
 - ✍ Agitar por inversión durante 15 minutos
 - ✍ Centrifugar a 13.000 RPM durante 6 minutos
 - ✍ Tomar la fase superior con una micropipeta
8. Repetir el procedimiento con cloroformo – alcohol isoamilico
9. Transferir la fase superior a otro tubo eppendorf que contiene 400 uL de isopropanol frío y agitar 8 veces suavemente
10. Almacenar a –20°C durante 30 minutos (opcional se puede dejar por mas tiempo o durante la noche)
11. Centrifugar a 13.000 RPM durante 6 minutos
12. Eliminar el sobrenadante (con bomba de vacío o invirtiendo los tubos) y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente
13. Resuspender el precipitado en 50 – 100 uL de TE pH 8.0
14. Agregar 5 uL de RNAsa a una concentración de 0.625 unid/uL
15. Incubar a 37°C durante 15 – 30 minutos
16. Si esta resuspendido en 50 uL, agregar:
 - ✍ 25 uL de acetato de sodio 3 M pH 5.5
 - ✍ 250 uL de etanol absoluto frío
 - ✍ 100 uL de agua destilada estéril
 - ✍ Agitar en vortex
17. Dejar los tubos a –20°C de un día para otro
18. Centrifugar a 14.000 RPM durante 20 minutos a 4°C
19. Lavar con etanol:
 - ✍ Agregar 1 ml de etanol al 70 - 75%
 - ✍ Centrifugar a 14.000 RPM durante 5 minutos a 4°C
 - ✍ Secar el etanol aspirando con la bomba de vacío o invirtiendo los tubos
20. Repetir el lavado con etanol
21. Dejar secar muy bien los tubos
22. Resuspender en 50 – 100 uL de TE pH 8.0 en 8 mM de NaOH
23. Almacenar a 4°C
24. Correr el ADN en gel de agarosa al 0.8%

Anexo I. Protocolo modificado para extracción de ADN de *P. infestans*

1. Se macera con Nitrógeno líquido cada micelio, y en tubos eppendorf se colocan aproximadamente 100 mg. Se almacenan a -80°C .
2. Precalentar el Buffer de extracción CTAB 2x a 65°C 5 minutos
3. A cada tubo eppendorf se agregan 400 uL de CTAB 2X y se incuban a 65°C en baño María durante 30 minutos. Se mezcla por inversión cada 5 minutos.
4. En cámara de extracción agregar a cada tubo 400 uL de Cloroformo - alcohol isoamílico (24:1). Se mezcla por inversión durante 15 minutos.
5. Centrifugar a 13.000 RPM durante 6 minutos. Se toma la fase superior con una micropipeta de 100 uL y se coloca en tubos eppendorf nuevos previamente marcados.
6. Agregar nuevamente 400 uL de Cloroformo - alcohol isoamílico a cada tubo, se agita por inversión durante 15 minutos y se centrifuga a 13.000 RPM durante 6 minutos.
7. Transferir a otro juegos de tubos eppendorf la fase superior del centrifugado con 400 uL de Isopropanol frío y agitar suavemente 8 veces por inversión
8. Almacenar a -20°C durante 30 minutos o más.
9. Centrifugar a 13.000 RPM durante 6 minutos
10. Eliminar el sobrenadante invirtiendo los tubos y dejar secar a temperatura ambiente (se utiliza rollitos de toallas absorbentes)
11. Resuspender el precipitado en 80 uL de Buffer TE
12. Se almacena a 4°C hasta su posterior análisis.

NOTA: si es necesario transportar el ADN precipitado, se agrega 70 uL de Isopropanol frío, 10 uL de Acetato de Sodio 3 M, se mezcla y se congela durante 10 minutos, luego se centrifuga a 14.000 RPM durante 20 minutos. Se elimina el sobrenadante y se seca, luego se agrega 1 ml de etanol al 70 %.

Para correr las muestras en gel de agarosa al 0.8 % se vuelve a resuspender en 100 uL de Buffer TE pH 8.0 y se almacena a 4°C .

Anexo J. Electroforesis del ADN - Preparación del Gel de Agarosa

Para una cámara de electroforesis CBS Cientific MGU 152T .

1. 18 ml de TAE o TBE 1X
2. 0.144 g de azarosa
3. 0.5 ul de bromuro de tidio

Anexo K. Formato para PCR

HAPLOTIPOS PHYTOPHTHORA			
	Volumen	Muestras =	Primer
Primer F			
Primer R			
DNTPs			Program
TAQ			
BSA			
DNA			Obs.
MgCl ₂			
Buffer PCR			
Agua			Fecha
TOTAL			

Anexo L. Formato para Digestiones

HAPLOTIPOS PHYTOPHTHORA - DIGESTIONES			
	Volumen	Muestras =	Enzima
Buffer 10 X			
Enzima			Programa
DNA (Amplif)			
Agua			Obs.
Total			