

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora infestans* AISLADO DE
Solanum betaceum EN LOS DEPARTAMENTOS DE NARIÑO Y
PUTUMAYO MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

MARÍA GABRIELA DORADO YÉPEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

SAN JUAN DE PASTO

2014

VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora infestans* AISLADO DE
Solanum betaceum EN LOS DEPARTAMENTOS DE NARIÑO Y
PUTUMAYO MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

MARÍA GABRIELA DORADO YEPEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Bióloga

Directores

LUZ ESTELA LAGOS MORA

MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OSCAR BURBANO FIGUEROA

MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

SAN JUAN DE PASTO

2014

Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva del autor

Artículo 1ro del Acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

LUZ ESTELA LAGOS MORA

Director

OSCAR ALBERTO FIGUEROA

Director

ELKIN ALEXI NOGUERA URBANO

Jurado

JUAN PABLO GARCIA LÓPEZ

Jurado

DEDICATORIA

A Dios por ser la fuerza que me impulsa a hacer las cosas bien y a actuar con sabiduría, con el corazón y por bendecir mis sueños.

Dedico este trabajo de grado especialmente a ti madre, por tu amor incondicional, confianza, y por todos los sacrificios que día a día durante estos años realizaste para educarme sin importarte las consecuencias, y por enseñarme, mediante el ejemplo, a no rendirme jamás y a luchar por cada meta. Es mucha la paciencia que has tenido para ver llegar este momento, pero finalmente aquí está, con todo mi corazón...

A Juan Carlos y Daniela por todo su cariño, amor y por ser el gran apoyo, compañía diaria y la felicidad de mi Madre.

A mi abuelita Martha por ser el pilar de mi familia y a mi abuelito José (q.e.p.d) como un reconocimiento a su gran espíritu de trabajo, disciplina, fortaleza y por todo el amor que me brindo.

A mi tía Mariela por su amor, compañía, apoyo incondicional cada día y siempre que lo necesité y sobre todo por confiar en mí.

A mis tíos, primos por cada día que me vieron crecer y aportaron a mi formación personal y por regalarme tantas sonrisas, alegrías y sustos al crecer juntos y verlos crecer.

A Nando por todo su amor, apoyo y tiempo para mí.

A toda mi familia por todo el cariño que me han prodigado.

Gabriela D.

AGRADECIMIENTOS

Fue posible realizar este trabajo gracias al apoyo del grupo de investigación Genética y Evolución de Organismos Tropicales – GENPAT, por toda su contribución durante su desarrollo; a todos sus integrantes por su colaboración, experiencia y por hacer muy ameno el trabajo tanto en laboratorio como en campo.

A la Universidad de Nariño por ser el templo de todo mi aprendizaje y formación profesional y personal.

Y un agradecimiento especial a mis asesores la Msc Luz Estela Lagos y Msc Oscar Burbano Figueroa quienes mediante su motivación, orientación, paciencia, comprensión y amistad siempre me insistieron a perseverar para alcanzar mis metas, demostrándome que podía llegar más allá de mis propias expectativas.

Mil Gracias a mis Jurados MsC Elkin Noguera y Juan Pablo García, por cada una de sus recomendaciones y observaciones a mi trabajo, porque con su apoyo logre consolidar este trabajo, y a la MsC Sonia Jaramillo quien también aportó con su experiencia en este tema.

Al Departamento de Biología y a todos los docentes que lo conforman gracias por sus aportes en todos los campos de esta profesión llena de vida.

A todos mis amigos y compañeros, Eliana, Marcela, Isabel, Karen, Carolina, Mónica, Sandra, Diana, Claudia, Jurany, Cesar y Juan por compartir tantos momentos, experiencias durante toda la carrera y dentro y fuera de la Universidad.

TABLA DE CONTENIDO

	Pagina
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE ANEXOS.....	15
GLOSARIO.....	16
ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN.....	20
ABSTRACT.....	21
1. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.....	22
2. JUSTIFICACIÓN.....	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4.MARCO TEÓRICO.....	29
4.1 Phytophthora infestans.....	29
4.1.1. Posición Taxonómica.....	29

4.1.2 Ciclo Biológico de <i>P. infestans</i>	30
4.1.3 Origen y Distribución de <i>Phytophthora infestans</i>	32
4.1.4. Patogenicidad	34
4.2 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES DE <i>Phytophthora infestans</i>	35
4.2.1. Razas fisiológicas	36
4.2.2. Tipo de apareamiento	37
4.2.3. Sensibilidad al Metalaxyl	38
4.2.4. Haplotipos mitocondriales (RFLP-PCR)	39
4.2.5 Secuencias microsatélites o SSR.....	40
5. METODOLOGÍA.....	44
5.1 Localización del Área de Estudio.....	44
5.2 Colección de Aislamientos	46
5.3 Caracterización molecular de <i>P. infestans</i> mediante marcadores microsatélites.....	46
5.3.1 Obtención de Micelio para extracción del ADN.....	46
5.3.2 Extracción del ADN.....	47
5.3.3 Caracterización molecular mediante marcadores microsatélites.....	50
5.3.4 Análisis Estadístico.....	53

6. RESULTADOS.....	56
6.1 Aislamientos.....	56
6.2 Extracción de ADN.....	57
6.3 Caracterización molecular de <i>P. infestans</i> mediante marcadores Microsatélites.....	58
6.4 Análisis de diversidad genética.....	63
6.5 Análisis de similitud genética y agrupamientos.....	68
6.6 Distribución Geográfica.....	74
7. DISCUSIÓN.....	75
7.1 Análisis de diversidad genética.....	75
7.2 Estructura Poblacional y distribución geográfica	82
CONCLUSIONES.....	86
RECOMENDACIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	88
ANEXOS.....	104

LISTA DE TABLAS

Página.

Tabla 1. Iniciadores y primers microsátélites, longitud del producto (pb) y número de alelos en 175 aislados de <i>Phytophthora infestans</i>	41
Tabla 2. Secuencias de primers reportadas para la caracterización molecular de las poblaciones de <i>Phytophthora infestans</i> (Knapova y Gisi, 2002 y Lees <i>et al.</i> , 2006).....	50
Tabla 3. Condiciones y temperaturas de amplificación para marcadores microsátélites.....	51
Tabla 4. Protocolo de tinción nitrato de plata. (CIP, 2000).....	52
Tabla 5. Aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> procedentes de los Departamento de Nariño y Putumayo utilizados en el estudio de la caracterización genética.....	56
Tabla 6. Alelos obtenidos en cada uno de los aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> con los 6 locus analizados expresados en tamaño (pb).....	62
Tabla 7. Frecuencia de los alelos encontrados con 6 marcadores microsátélites en las poblaciones de <i>Phytophthora infestans</i> estudiadas.....	64

Tabla 8. % de loci polimórficos, Índice de diversidad de Shannon (I), Heterocigosidad observada (Ho), y Heterocigosidad esperada (He) identificados dentro de la colección de *Phytophthora infestans* de Putumayo y Nariño.....66

Tabla 9. Alelos únicos por población de *Phytophthora infestans*67

Tabla 10. Identidad genética (GI) y distancia genética (GD) calculadas según Nei (1978) para las poblaciones de Nariño y Putumayo identificados dentro de la colección de *Phytophthora infestans* de Putumayo y Nariño.....67

Tabla .11 Análisis de varianza molecular (AMOVA) para el análisis de 30 aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de tomate de árbol (*S. betaceum*) en los Departamentos de Nariño y Putumayo, mediante marcadores Microsatélites.....68

Tabla .12 Haplotipos encontrados en el análisis de 30 aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de tomate de árbol (*S. betaceum*) en los Departamentos de Nariño y Putumayo, mediante marcadores Microsatélites.....72

LISTA DE FIGURAS

Página.

Figura 1. Localidades muestreadas en el Departamento de Nariño.....	45
Figura 2. Localidades muestreadas en el Departamento de Putumayo.....	45
Figura 3. Obtención de micelio de <i>Phytophthora infestans</i> mediante filtración de cultivos sembrados en caldo arveja.....	47
Figura 4. Protocolo de extracción de ADN de <i>Phytophthora infestans</i> descrito por Griffith y Shaw (1998).....	49
Figura 5. Montaje, corrida y tinción de gel de Poliacrilamida.....	53
Figura 6. Extracción de ADN de <i>Phytophthora infestans</i>	58
Figura 7. Amplificación con microsatélite 2D de 15 aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).....	59
Figura 8. Amplificación con microsatélite PI63 de 15 aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).....	59
Figura 9. Amplificación con microsatélite 4B de 15 aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).....	60

Figura 10. Amplificación con microsatélite G11 de 15 aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).....	60
Figura 11. Amplificación con microsatélite PI66 de 15 aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).....	61
Figura 12. Amplificación con microsatélite 1F de 15 aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).....	61
Figura 13. Distribución de las frecuencias alélicas encontradas con 6 locus microsatélites en las poblaciones de <i>Phytophthora infestans</i> de Putumayo y Nariño.....	65
Figura 14. Dendrograma generado a partir del análisis con seis cebadores microsatélites en una población de 30 aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> procedentes de Nariño y Putumayo.....	69
Figura 15. Número estimado de grupos para las dos poblaciones de Nariño y Putumayo.....	71
Figura 16. Porcentaje de mezcla de cada aislamiento en consideración a los grupos.....	71
Figura 17. Red mínima de expansión de las poblaciones.....	73

Figura 18. Distribución geográfica de los aislamientos caracterizados en este estudio.....74

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Formato de registro de los cultivos de *Solanum betaceum* utilizados en el estudio.

ANEXO B. Registro de Aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes de Nariño y Putumayo incluidos en esta caracterización.

GLOSARIO

Codominancia: relación entre dos alelos de un gen, en la que ambos están fenotípicamente expresados en los individuos heterocigotos.

Desnaturalización: técnica que permite la separación de cadenas complementarias de una molécula de ADN. El ADN se desnatura si se coloca en álcalis (0.2N NaOH) o cuando se hierve (fusión), también actúa cambiando la conformación de la estructura de una proteína sin que cambie la secuencia de aminoácidos que la componen

Genética de poblaciones: rama de la genética que estudia el comportamiento de los genes en las poblaciones; también puede definirse como la rama de la genética que describe en términos matemáticos, las consecuencias de la herencia mendeliana a nivel poblacional.

Haplotipo: serie de polimorfismos relacionados que se heredan como una unidad, un haplotipo puede ser considerado un rasgo de ADN heredado de un linaje parental. Los haplotipos son usados frecuentemente para comparar diferentes poblaciones.

Heterotálico: término referido a una especie constituida por individuos auto estériles (auto incompatibles), que para la reproducción sexual requieren la unión de gametos compatibles. Se refiere igualmente a una especie en la cual los sexos se presentan en talos separados, de modo que para efectuar la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes.

Linaje clonal: los descendientes asexuales de un genotipo dado que difieren del ancestro clonal únicamente por mutación o por recombinación mitótica y generalmente representan una gran similitud genética entre individuos

Locus: lugar en un mapa genético en el que reside una mutación o un gen particular; a menudo se usa en lugar de mutación o gen. Región del cromosoma. Sitio específico del ADN. Secuencia en un cromosoma.

Oomycete: (Oomycota) grupo de protistas filamentosos superficialmente parecidos a hongos. El grupo engloba especies tanto saprófitas como parásitas que actúan contra animales acuáticos y plantas. Presentan características como membranas celulares compuestas de celulosa y generalmente no tienen septación.

Parasexualidad: proceso que tiene lugar en los hongos e implica cambios en el número cromosómico, pero que difiere en lugar y tiempo del ciclo sexual. Consiste en un proceso de heterocariosis, cariogamia, recombinación, segregación mediante entrecruzamiento mitótico y haploidización. La parasexualidad se asemeja a la reproducción sexual, mediante este proceso un organismo adquiere información genética de otro organismo, en un proceso independiente de la reproducción.

Patosistema: subsistema dentro del sistema agrícola caracterizado por el fenómeno de parasitismo. Está constituido por un hospedante susceptible, un patógeno virulento y un ambiente predispuesto a la enfermedad.

Polimorfismo: la presencia de varias formas (de un rasgo o de un gen) en una población; la proporción de loci génicos polimórficos en una población. Es la existencia de dos o más elementos genéticos contrastantes en una

población a frecuencias mayores que las que pueden ser debidas a mutaciones recurrentes. El polimorfismo se debe a mutaciones, deleciones e inserciones de ATCG. Un sistema genético polimórfico tiene dos o más alelos en los que la frecuencia del más raro es mayor de 0.01 (1%) en la población.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AFLPs: polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción amplificados por PCR.

CTAB: bromuro de cetil-trimetilamonio.

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

EDTA: ácido Etilendiaminotetraacético

g: gramo

mg: miligramo

ml: mililitro

mM: milimolar

DNAmt: ADN mitocondrial

ng: nano gramo

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

r: coeficiente de fenético.

RAPDs: ADN polimórfico amplificado al azar.

RFLP: polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto

SSRs: repeticiones simples de secuencia.

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: tris borato EDTA

µl: microlitro

UPGMA: método de pares no ponderados usando medias aritméticas.

V: voltios

RESUMEN

El tomate de árbol *Solanum betaceum* es uno de los principales productos agrícolas del Valle de Sibundoy y de algunos municipios del Departamento de Nariño, y una de las enfermedades más limitantes en su producción es la gota o tizón tardío causado por el oomicete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. En este estudio se realizó la caracterización genética de dos poblaciones de *P. infestans*, procedentes de la zonas del Valle de Sibundoy y del Departamento de Nariño, cada población con 15 aislamientos obtenidos de cultivos de *S. betaceum*, utilizando marcadores microsátélites (SSR) según la metodología de Knapova y Gisi, (2002) y Lees *et al.*, (2006). Para la evaluación de la variabilidad genética se realizó la extracción de ADN a partir de micelio seco con 10 días de crecimiento en caldo arveja, y se realizó una amplificación con las secuencia de primers SSR Pi63, Pi66, G11, 1F, 4B y 2D (Knapova y Gisi, 2002 y Lees *et al.*, 2006), las cuales fueron reveladas en un gel de poliacrilamida al 6 %. Los resultados de esta caracterización revelaron la presencia de 24 alelos en las poblaciones y más de dos alelos por locus, presentando un 100 % de polimorfismo, a su vez el análisis de varianza molecular (AMOVA) demostró que la variación intrapoblacional es del 84 % y la interpoblacional del 16 %, concluyendo que hay un nivel considerable de variabilidad genética en las dos poblaciones a pesar de ser patógenos con reproducción asexual, por lo cual se considera la recombinación mitótica y las mutaciones como la causa de dicha variabilidad. Así mismo el análisis de agrupamiento distribuyó los 30 aislamientos en tres grupos en donde los aislamientos contenidos en cada uno comparten valores de similitud mayores a 0.90, y al relacionarlos con su distribución en el mapa se observó cierta subestructuración geográfica de las poblaciones estudiadas la cual no se ha reportado antes.

ABSTRACT

Tree tomato *Solanum betaceum* is one of the main agricultural products Valley Sibundoy and municipalities in the Department of Nariño, and one of the most limiting diseases in its production is gout or late blight caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont .) de Bary . In this study the genetic characterization of two populations of *P. infestans*, from the Valley Sibundoy and the Department of Nariño, each population with 15 isolates obtained from cultures of *S. betaceum*, using microsatellite markers (SSR) was performed as Knapova methodology and Gisi, (2002) and Lees *et al.*, (2006). To evaluate the genetic variability of DNA extraction was performed from dry mycelium with 10 days of growth in pea broth, and amplification was performed with primers SSR sequence Pi63, Pi66, G11, 1F, 4B and 2D (Knapova and Gisi, 2002 and Lees *et al.*, 2006), which were revealed in a polyacrylamide gel 6%. The results of this characterization revealed the presence of 24 alleles in populations and more than two alleles per locus, showing a 100 % polymorphism turn the analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the within variation is 84% and interpopulational 16%, concluding that there is a considerable level of genetic variability in two populations despite being asexual pathogens, which is considered by mitotic recombination and mutations as the cause of the variability. Also the cluster analysis distributed the 30 isolates into three groups where each contained isolates share greater similarity values to 0.90, and relate them to their distribution in certain geographical map sub - structuring of the populations studied was observed which has not been reported before.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tomate de árbol *Solanum betaceum*, es uno de los principales productos agrícolas del Valle de Sibundoy y de algunos municipios del Departamento de Nariño; el área de este cultivo en diferentes regiones de nuestro país se ha incrementado durante la última década, debido al aumento de la demanda ocasionada por un mejoramiento en el hábito de consumo, por la ampliación del mercado internacional, además de la buena calidad, la rápida producción y los precios bajos, en comparación con otras frutas utilizadas en la canasta familiar (Espinal *et al.*, 2005).

La gota o tizón tardío es la enfermedad más limitante de los cultivos de *S. betaceum* en esta zona, y de solanáceas en el mundo. Su agente causal, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es un oomicete heterotálico que presenta dos tipos de apareamiento (A1 y A2) y que define en buena parte la estructura poblacional del patógeno en las diferentes regiones del mundo. El impacto de *P. infestans* en los cultivos de solanáceas ha sido significativo, causando serios desastres socioeconómicos y destruyendo totalmente plantaciones en poco tiempo (Agrios, 2005).

En los últimos años gran parte de estudios relacionados con la epidemiología de esta enfermedad se han enfocado hacia el patosistema *Solanum tuberosum/P. infestans*, revelando una amplia dinámica de las poblaciones del patógeno (Páez *et al.*, 2005). Ejemplo de ello es la aparición de cepas resistentes al producto químico de acción sistémica Metalaxyl utilizado para el control del patógeno y la presencia de un tipo diferente de apareamiento A2 en varios países de Europa, Oriente Medio, Asia y Sudamérica, lo que condujo a que la población A1 fuera reemplazada por una nueva variante

A1/A2, que se caracteriza por ser altamente virulenta y variable, lo cual le ha permitido adaptarse a nuevos hospederos y a diferentes condiciones ambientales (Mesa *et al.*, 2008).

La adaptación de *P. infestans* se acrecentó además con la presencia de fenómenos migratorios (Gisi y Cohen, 1996; Goodwin y Drenth, 1997), los cuales han afectado significativamente la variabilidad del patógeno y han favorecido el reemplazo poblacional (Samaucha y Gisi, 1987).

Condiciones particulares de los ecosistemas tropicales incrementan notablemente la susceptibilidad de los cultivos de solanáceas a la infección por *P. infestans* (Zapata, 2002). En el Valle de Sibundoy y en el departamento de Nariño la presencia de condiciones climáticas conducentes a la enfermedad, la ausencia de épocas definidas de siembra y la disponibilidad de fuentes constantes de inóculo en campo, han desarrollado un ambiente propicio para el establecimiento del patógeno. Bajo estas condiciones las poblaciones del patógeno pueden desarrollar individuos con niveles incrementados de virulencia y mayor éxito reproductivo (Garrett *et al.*, 2001). El bajo conocimiento genotípico y fenotípico de las poblaciones de *P. infestans*, ha generado una idea errada acerca del comportamiento del patógeno en América del Sur (Adler *et al.*, 2002). Por ejemplo en hospederos diferentes a los convencionales como *S. tuberosum* o *S. lycopersicum*, se han subestimado su variabilidad genética en algunas regiones donde se presenta la enfermedad (Gómez *et al.*, 2009; Mideros, 2008).

En el caso de *S. betaceum*, los estudios de las poblaciones de *P. infestans* que atacan los cultivos en la zona de estudio son muy escasos. Para la región solo se conocen los reportes de Mideros, (2008), los cuales indican que existe más de una población de *P. infestans* atacando al tomate de árbol. De igual forma las poblaciones encontradas son diferentes a las

previamente reportadas, ya que presentan elevados niveles de agresividad con respecto a poblaciones asociadas al linaje EC-3 ampliamente conocido para *S. betaceum*. Un estudio previo (Revelo *et al.*, 2011) reveló diferencias cuantitativas en la virulencia de las poblaciones (EC-3 y Hsb1) de *P. infestans* en *S. betaceum*. Estas poblaciones deben estar sometidas a subestructuración geográfica en función de la resistencia de las variedades de tomate predominantes. El uso de marcadores moleculares intrapoblacionales permitirá dilucidar esta hipótesis. (Revelo *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta el bajo conocimiento y la importancia de conocer la variabilidad genética intrapoblacional del patógeno *P. infestans* en *S. betaceum*, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el grado de variabilidad genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* aisladas de tomate de árbol provenientes de Nariño y Putumayo?

2. JUSTIFICACIÓN

La importancia de la familia Solanaceae se reconoce mundialmente por el amplio rango de utilidad agronómica de sus especies, en su mayoría cultivables. Colombia por ser un país que presenta variedad de climas, garantiza la producción permanente de muchas especies de esta familia, que son una alternativa promisoría de cultivos con mejores posibilidades de competencia en escenarios de mercados globalizados. Sin embargo, uno de los problemas más graves es su alta susceptibilidad a patógenos, y en caso particular a la enfermedad conocida como tizón tardío o gota, causada por el patógeno *P. infestans*, que presenta una alta incidencia afectando significativamente la producción y ocasionando importantes pérdidas a los agricultores (Carreño *et al.*, 2007).

Dentro de la familia de las solanáceas se encuentra el tomate de árbol, cultivo que representa el 5.3% de la producción frutícola nacional, y se constituye en una de las actividades más importantes, convirtiendo a Colombia en primer exportador en el mundo (Bernal *et al.*, 2003), y donde los departamentos de Nariño y Putumayo y los municipios que se tuvieron en cuenta en ésta caracterización son unos de los productores de tomate de árbol. Lamentablemente en estas zonas se ha identificado la presencia del patógeno *P. infestans*, como causante de la gota o tizón tardío en los cultivos, siendo una de las más importantes limitaciones para su establecimiento. Estas limitaciones están relacionadas con el uso de agroquímicos, y en consecuencia el aumento en los costos de producción y los efectos perjudiciales al medio ambiente.

Además acarrea perjuicios económicos directos al productor, relacionados con la calidad del fruto, ya que se requiere que superen las pruebas de residuos tóxicos y otras exigidas por el mercado internacional (Espinal *et al.*, 2005).

Una de las características más sobresalientes de *P. infestans* y que ha sido documentada en diferentes regiones del mundo, tanto en *S. tuberosum* como en otras solanáceas es su gran variabilidad o complejidad patogénica (Derie e Inglis, 2001). Los principales mecanismos que justifican dicha variabilidad son: la posibilidad de la reproducción sexual, la hibridación somática de hifas y la variación poblacional del patógeno provocada por la presencia de genes *R* en la población de los cultivares comerciales (Shaw, 1991; Goodwin *et al.*, 1995). Características que aunadas a la posibilidad de migración de patotipos entre países y continentes, hacen posible que exista un gran dinamismo que favorece cambios en la composición genética de las poblaciones de *P. infestans* (Fry *et al.*, 1993; Goodwin *et al.*, 1998; Platt *et al.*, 1999).

En el caso de *P. infestans*, los estudios poblacionales de las dos últimas décadas, se han centrado en evaluar de manera efectiva la variación intraespecífica e interespecífica de las poblaciones de *Phytophthora* utilizando características fenotípicas (tipo de apareamiento, virulencia/agresividad de razas y sensibilidad a Metalaxyl u otros fungicidas), marcadores bioquímicos (isoenzimas *Gpi* y *Pep*) y moleculares (Polimorfismos en fragmentos de restricción en ADN nuclear y mitocondrial, pruebas de ADN, y PCR para la transcripción de regiones largas y cortas de la subunidad ribosomal del ADN, análisis fingerprinting usando la sonda RG57, PCR específico para detectar tipo de apareamiento, análisis ITS y microsatélites (Jaramillo, 2003; Páez *et al.*, 2005).

Sin embargo la urgencia de investigar más a fondo la estructura genética de las poblaciones colombianas de *P. infestans* promovió la realización de proyectos que evaluaran la variabilidad genética y patogénica del oomicete desde una perspectiva molecular. El conocimiento de este aspecto es de gran importancia en el entendimiento de los procesos involucrados en la patogenicidad y puede convertirse en una valiosa fuente de información para identificar (sub) poblaciones específicas del patógeno, relacionadas con una especie en particular de hospedero (especificidad de hospedero) o con una variedad (especificidad de cultivar), los genes que participen en la infección (efectores) responsables de la especificidad (factores de patogenicidad) y de la virulencia (factores de virulencia), determinan blancos químicos de ataque y permiten entender más claramente la estructura poblacional y la evolución de este importante patógeno (Restrepo *et al.*, 2008; Carreño, 2007)

Finalmente, en consideración al desconocimiento de la estructura poblacional del patógeno y al alto potencial económico de cultivos de *S. betaceum* en el Valle de Sibundoy y en las zonas central y norte de Nariño; el estudio genético de las poblaciones de *P. infestans* se convierte en una actividad necesaria que permitirá el conocimiento de la estructura genética y que proporcionará indicios claves acerca de la epidemiología, diversidad y patrones evolutivos del patógeno y nuevas evidencias de los cambios históricos y actuales de las poblaciones, cuya importancia es considerable en regiones susceptibles a una rápida invasión por linajes clonales con mayores niveles de virulencia (Kamoun *et al.*, 1999; Forbes *et al.*, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de variabilidad genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* aisladas de tomate de árbol (*S. betaceum*) en los municipios de Pasto, La Unión, Consaca, Buesaco e Iles del Departamento de Nariño y el Valle de Sibundoy en el Departamento del Putumayo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar molecularmente las poblaciones de *Phytophthora infestans* asociadas a tomate de árbol a partir de marcadores microsatélites.

Evaluar la relación de la variabilidad genética con los diferentes cultivares y si está subestructurada en términos geográficos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 *Phytophthora infestans*

Phytophthora significa destructor de plantas y la especie *infestans*, es el agente causante del tizón tardío o gota y se constituye como el factor más limitante de la producción en la mayoría de las localidades donde se cultivan las diferentes especies de Solanáceas, mostrando una gran virulencia en los cultivos del tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*) y papa (*Solanum tuberosum*).

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 su almacenamiento (Marín y Mira, 1998). Este patógeno 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 (Agrios, 2005).

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.

4.1.1. Posición Taxonómica

Phytophthora infestans perteneciente al Phylum Oomycota, reino Chromista se encuentra más relacionado con algas no fotosintéticas, debido a la composición de su pared celular de celulosa y producción de propágulos móviles flagelados (Agrios, 2006). Poseen gametos masculinos y femeninos y tienen hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la

presencia de agua. Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, se agruparon originalmente como hongos. 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, que los Oomicetos adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente que los hongos verdaderos (Kamoun, 2002).

Los Oomicetos 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). Los flagelos se presentan en pares, uno largo y adornado con mastigonemas distintivos y otro más corto, delgado, cilíndrico y en forma de flecha (Jaramillo, 2003).

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 haploide (Jaramillo, 2003).

4.1.2 Ciclo Biológico de *P. infestans*

P. infestans es un oomicete heterotálico con 2 tipos de apareamiento designados arbitrariamente como A1 y A2 (Páez, 2004). Cada tipo de apareamiento es bisexual, capaz de producir oogonios y anteridios a partir de la diferenciación de su micelio vegetativo. Cuando ambos tipos de

apareamiento están presentes, ocurre la fusión entre gametangios de tipos opuestos, lo cual resulta en la formación de una oospora.

Los tipos de apareamiento A1 y A2 son considerados grupos de compatibilidad y no formas sexuales, ya que el anteridio u oogonio de un tipo puede aparearse con el oogonio o anteridio, respectivo, del tipo opuesto. Contrario a las especies heterotálicas, como *P. infestans*, en las especies homotálicas de este género no hay diferenciación de tipos de apareamiento, por lo que la formación de la oospora ocurre a partir de la fusión de gametangios de un mismo individuo (Erwin y Ribeiro 1996).

La forma asexual es la más frecuente, las zoosporas biflageladas se enquistan y se vuelven redondas, pierden sus flagelos y secretan una pared exterior; 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 (Robertson, 1991). El micelio interior es intracelular y con presencia de haustorios 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 (Jaramillo, 2003).

El esporangióforo termina en un engrosamiento que posteriormente se separa en la forma de un esporangio alimonado, 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 germinan.

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%, aunque Andrivon, (1995) demostró que pueden permanecer viables en el suelo por varios meses dependiendo de las condiciones químicas, físicas y biológicas de éste.

4.1.3 Origen y Distribución de *Phytophthora infestans*.

Sobre el origen del patógeno existen tres hipótesis: la primera es la Andina, ésta tuvo 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 (1995) se basó en el supuesto de que *P. infestans* se debió originar en la misma parte del mundo que su hospedero, en la parte norte de los Andes Sudamericanos (Perú y Bolivia).

La segunda teoría es la mexicana, que propone como sitio de origen el Valle de Toluca, en este lugar 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 (Andrivon, 1995). La extrema diversidad del patógeno en las poblaciones de México Central fue ratificada con la utilización de técnicas moleculares por Calderón y Castro en el año 2002. Los 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 (Fry, 2001).

Una tercera teoría, conocida como la de "Tres Pasos" sugiere a México como el lugar de expansión del agente patógeno, pero que la fuente de inóculo para las epidemias del siglo XIX se originó en los Andes de América del Sur (Andrivon, 1996). Se ha especulado que *P. Infestans* emigró primero de

México a los Andes de América del Sur siglos antes de la década de 1840 y posteriormente se dispersaron de la región andina a los EE.UU. y Europa.

Datos recientes de análisis de los loci mitocondrial y nuclear de *P. Infestans*, apoyan firmemente a los Andes Suramericanos como el centro de origen. Esta historia evolutiva de *P. infestans* propone que una población ancestral de *Phytophthora* se dividió en diferentes linajes en los Andes de América del Sur, en asociación con especies silvestres de *Solanum*. Dos de los linajes divergentes dieron lugar a los haplotipos existentes de *P. infestans* capaces de infectar la papa, el tomate y otras especies de solanáceas. Otros linajes evolucionaron hasta convertirse en especies distintas, estrechamente relacionadas con *P. infestans* y morfológicamente idéntico a éste (aislados de la sección Anarrhichomenun).

La especificidad del hospedero se convirtió en la fuerza motriz para el mantenimiento de los linajes divergentes en Ecuador y Perú. Una fuente de inóculo andina inició las primeras epidemias en la Unión Soviética y después en Irlanda lo que llevó a la hambruna. Los resultados obtenidos de estos análisis de los loci nucleares y mitocondriales de *P. infestans*, proporcionan una fuerte evidencia de un origen de este patógeno "fuera de América del Sur" y demuestran claramente que la mayoría de las mutaciones en las cepas ancestrales se produjeron en los Andes Suramericanos (Alpizar *et al.*, 2007).

Fry y Goodwin (1993) 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 aloezimático, con marcada resistencia al Metalaxyl, y Fingerprinting del ADN diferente al de la población nativa y la cual ha venido sustituyendo a las poblaciones originalmente establecidas en

dicha zona. 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 que son afectadas de manera natural o artificial. Las colecciones de Bolivia han sido reportadas como tipo A2 con un solo linaje clonal, mientras en Brasil se han detectado dos linajes clonales con tipo de apareamiento A1 y A2 respectivamente y en Argentina se descubrieron aislamientos con tipo de apareamiento A2 (Fry y Goodwin, 1993).

4.1.4. Patogenicidad

Estudios en el Departamento de Putumayo, específicamente en el valle de Sibundoy mostraron que una población nueva del patógeno *P. infestans* asociado a *S. betaceum* muestra una agresividad similar a la establecida para el linaje clonal EC-3 (Revelo *et al.*, 2011). Este resultado apoya la idea de que el linaje EC-3 no es la población dominante en *S. betaceum* (Revelo *et al.*, 2011). Una caracterización intensiva de la población de aislados de *S. betaceum* puede permitir la determinación de cómo coexisten estos patógenos en el mismo hospedero, y el desplazamiento de un linaje clonal por uno nuevo; estos procesos están bien documentado en la papa y el tomate de mesa, ya que ambos cultivos son de temporada y un área particular de papa o tomate puede ser rápidamente sustituida, es así que cuando estos dos cultivos se rotan una población de patógenos previamente no adaptados puede adaptarse al nuevo hospedero y comenzar así una epidemia.

En el caso de *S. betaceum*, donde el inóculo es constante y el hospedero permanece durante un largo tiempo, la aparición de una nueva población no se puede explicar de esa manera, *S. betaceum* presenta una gran diversidad de variedades locales o semi cultivares nacionales adaptados a

regiones específicas. Así este trabajo también evidencio diferencias cuantitativas en la agresividad entre aislados de *S. betaceum* y *S. tuberosum* en los dos cultivares de *S. betaceum* indicando una especificidad del hospedero, y para una área geográfica determinada y así la aparición de un nuevo haplotipo en *S. betaceum* con evidencia de alta agresividad, demuestra que las poblaciones clonales asociadas a cada uno de los hospederos son dinámicas.

El estudio de Revelo *et al.*, (2011) sobre la patogenicidad en el valle de Sibundoy (Putumayo) incluyó únicamente dos cultivares de tomate y un número limitado de cepas de *P. infestans* ya que aislamientos provenientes de *S. betaceum* eran difíciles de aislar y sólo una pequeña proporción de ellos sobrevivieron al aislamiento y purificación. Mideros asegura que las, EC-3 y las poblaciones HSB-1 puede exhibir un comportamiento diferente y esta es una oportunidad de analizar dos poblaciones diferentes de clones de *P. infestans* compitiendo en una variedad de hospederos (Mideros. 2008).

4.2 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES 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 genómico (Carter *et al.*, 1990). 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: el análisis de isoenzimas, el análisis del genoma mitocondrial (ADNmt) empleando la técnica de PCR-RFLP's, RAPDs, ITS, microsatélites y el Fingerprinting de ADN nuclear, empleando la técnica de RFLP's con la sonda RG57 (Fry *et al.*, 1991; Goodwin *et al.*, 1994; Griffith y Shaw, 1998).

En Colombia, los estudios sobre la composición de las poblaciones del patógeno, se enfocaron en un principio a la identificación de las razas fisiológicas. Sin embargo la urgencia de investigar más a fondo la estructura genética de las poblaciones colombianas de *P. infestans* promovió la realización de proyectos que evaluaran la variabilidad genética y patogénica del oomicete.

4.2.1. Razas fisiológicas

Desde 1949, se han llevado a cabo estudios sobre la reacción de las especies y variedades de la Colección Central Colombiana de Papa a diferentes aislamientos del patógeno *P. infestans*. Los primeros experimentos fueron realizados por De Rojas Peña *et al.*, (1953), quienes reportaron una amplia distribución de la raza A, la cual afecta solo a uno de los diferenciales empleados para la evaluación (*S. tuberosum*), y una muy poco frecuente y fragmentada distribución de la raza D que afecta dos de los diferenciales empleados para la evaluación (*S. tuberosum* y 2LY-13) y que parece estar relacionada con la raza A. Estos resultados fueron confirmados por Guzmán citado por Mazo *et al.*, (1995), quien encontró además el primer registro de la raza 3,4. Actualmente se conocen 12 genes de resistencia (R) que permiten llevar a cabo la caracterización de las razas.

Teóricamente, tales genes pueden estar presentes en 4096 (1212) posibles combinaciones, incrementando la posibilidad de encontrar diferentes razas de *P. infestans*, igual al número de combinaciones anteriormente descritas (Mazo *et al.*, 1995), de las cuales en Colombia, han sido reportadas hasta 19 razas provenientes de poblaciones con una alta complejidad patogénica (Mazo *et al.*, 1995; Marín *et al.*, 1998; Gilchrist, 2001).

4.2.2. Tipo de apareamiento

En Colombia se han realizado monitoreos temporales de aislamientos colectados de papa y de otros hospederos para determinar el tipo de apareamiento presente. Hasta el año 2004, los estudios realizados solamente han detectado la presencia del tipo de apareamiento A1, indicando que el oomicete se reproduce asexualmente, evitando el incremento de mayores proporciones en su variabilidad. Sin embargo, la presencia del tipo de apareamiento A2 en otros países y en consecuencia, la reproducción sexual de éste, permitió el desarrollo de razas nuevas, diferentes y más diversas que en Colombia (Mazo *et al.*, 1995; González, 1997; Marín *et al.*, 1998; Gilchrist, 2001; Lagos, 2002; León, 2004).

En Ecuador se ha reportado recientemente la presencia del tipo A2 en especies silvestres del grupo *Anarichomenum* (Ordóñez *et al.*, 2000). Este hecho hace pensar que las poblaciones A2 pueden interactuar físicamente con el resto de las poblaciones A1, lo que tendría efecto en la dinámica de la enfermedad.

Pérez *et al.*, (2001) reportan en el Perú la presencia de nuevos genotipos para la región previamente registrados en Ecuador, Colombia y Venezuela. Igualmente en Ecuador, donde se reporta la más alta diversidad genética de las poblaciones de *P. infestans* respecto a otros países Andinos (Adler *et al.*,

2004), los cambios más destacados involucran la aparición del tipo de apareamiento A2 en especies de tipo silvestre (Oyarzun *et al.*, 1997; Ordoñez *et al.*, 2000) y el desplazamiento del genotipo US-1 por el EC-1, en cultivos de papa y tomate (Forbes *et al.*, 1997). En Colombia es evidente la presencia de los linajes EC-1 y EC-3 que se asumen provienen del Ecuador (Lagos, 2002; Gómez *et al.*, 2009).

Recientes estudios empleando más de 100 aislamientos de *P. infestans* provenientes de cultivos de solanáceas pertenecientes a las especies *Solanum phureja* (papa criolla), *Solanum tuberosum* (papa), *Solanum lycopersicum* (tomate), *Physalis peruviana* (uchuva), *Solanum betaceum* (tomate de árbol) y *Solanum quitoense* (lulo), fueron caracterizados genética y fenotípicamente. En la caracterización fenotípica en relación a su tipo de apareamiento (A1 ó A2) se detectó que 1 de 100 aislamientos presentaba el tipo de apareamiento A2 y provenía de *P. peruviana* (Vargas *et al.*, 2008), pero hasta el momento ningún evento de reproducción sexual ha sido documentado.

4.2.3. Sensibilidad al Metalaxyl

El Metalaxyl [metil N-(2- metoxiacetil) – N – (2,6 xylil) DL alanina] pertenece al grupo de las acilaninas dentro de la clase de las fenilamidas, una clase de compuestos sistémicos que muestran actividad protectante, curativa y de erradicación de hongos. Su espectro de acción se limita a 10 géneros de oomicetos, dentro de los cuales se encuentra *Phytophthora*. Actúa inhibiendo el metabolismo de los ácidos nucleicos y la síntesis de proteínas a través de la inhibición de la ARN polimerasa o de otros factores que participan en el proceso de regulación de la expresión génica (Ortiz *et al.*, 1990; López *et al.*, 1997).

Los aislamientos de *P. infestans* resistentes a fenilamidas, gradualmente han ido conformando una parte importante de las poblaciones en muchos sitios. Navarro *et al.*, (1981) reportaron la disminución de la efectividad del producto químico Metalaxyl en las regiones productoras de papa de Antioquia, lo cual incrementó la incidencia de la enfermedad en la zona. Los estudios realizados hasta ahora revelan un aumento de poblaciones tolerantes al Metalaxyl, tanto en el departamento de Antioquia (Rave *et al.*, 1998) como en el Altiplano Cundiboyacense (González, 1997; Espitia, 2005).

En Nariño, Lagos (2002) evaluó 63 aislamientos de *P. infestans* y el comportamiento de la población fue variable frente al grado de sensibilidad a Metalaxyl, encontrando que la composición de la población de *P. infestans* en el departamento de Nariño fue 76% sensible; 11% con un comportamiento de resistencia intermedia baja; 2% de los aislamientos mostraron resistencia intermedia alta y 11% se clasificaron como resistentes. Los valores de EC50 se encontraron entre 0.09 y 1393 ug/ml; registros superiores solamente se presentaron en ciertos aislamientos donde el crecimiento en las concentraciones entre 0.2 y 200 ug/ml fueron mayores que la del control.

4.2.4. Haplotipos mitocondriales (RFLP-PCR)

Las variables mitocondriales hasta ahora reportadas en el mundo para *P. infestans* son llamadas: Haplotipos I-a, II-a, I-b y II-b. En las poblaciones colombianas del patógeno se ha reportado la ocurrencia de los haplotipos II-a y I-b (Jaramillo, 2003; Gilchrist, 2001; León, 2004). En el caso de tomate de árbol (*S. betaceum*) los estudios en torno a las poblaciones de *P. infestans* que atacan este cultivar son muy escasos. Para la zonas de estudio a evaluar en este trabajo se conocen los reportes de Lagos, 2002 donde 45 aislamientos de *P. infestans* procedentes de la zona productora de papa del departamento de Nariño y un aislamiento procedente de *S. betaceum*, fueron

evaluados en su genoma mitocondrial, mediante la metodología de PCR-RFLP's de haplotipos mitocondriales, los resultados muestran claramente la presencia del haplotipo mitocondrial IIa que corresponde al genotipo EC-1 en los 45 aislamientos procedentes de su hospedero *S. tuberosum*, y el aislamiento adicional procedente de *S. betaceum* corresponde al haplotipo Ib perteneciente al genotipo US-1.

Así mismo Gómez *et al.*, (2009) mediante la misma técnica 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 otras solanaceas 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. (Mideros, 2008)

4.2.5 Secuencias microsatélites o SSR.

Las secuencias repetitivas de copia única (Simple Sequence Repeat), son un componente integral de los genomas de los eucariontes y que en ciertos organismos podrían comprender más del 90% del ADN total. Acorde a la manera como estén organizados estos pueden ser extendidos internamente o repetidos en tándem. Los primeros ocurren en diversos sitios a través de

todo el genoma mientras que los segundos consisten en arreglos de dos hasta cien de con un inicio y un terminal definidos. Las secuencias microsatélites en general se caracterizan por arreglos cortos de secuencias (1 a 6 pb) que se repiten en bajo grado (Garnica *et al.*, 2006).

Para el caso de *P. infestans* se desarrollaron por primera vez Centro Internacional de la Papa- Quito en 2006, usando la librería genómica del patógeno enriquecida con repeticiones (TC)*n*. En total se seleccionaron seis marcadores microsatélites para la caracterización de los aislados de *P. infestans.*, denominados Pi 4B, Pi 4G, Pi G11, Pi 1D, Pi 2D, Pi 2H. (Tabla 1). Los productos microsatélites fueron llevados a cabo mediante la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), y separados posteriormente mediante un proceso de electroforesis en una cámara de secuenciación en arreglo vertical durante toda la noche en un gel denaturante de matriz de poliacrilamida al 6% y teñido con nitrato de plata (Jarrin, 2006).

Tabla 1. Iniciadores y primers microsatélites, longitud del producto (pb) y número de alelos en 175 aislados de *P. infestans*.

Iniciadores y primers microsatélites, longitud del producto (bp) y número de alelos en 175 aislados de <i>P. infestans</i>					
Locus	Secuencia Microsatélite	Secuencia de primers o iniciadores	Longitud del producto (bp)	No. de alelos	Locus mono-/polimórfico
Pi4B	(TC) ₃₄	F: AAAATAAAGCCTTTGGTTCA R: GCAAGCGAGGTTTGTAGATT	218	4	polimórfico
Pi4G	(TC) ₂₇	F: CGCTGTGT.GGATGACAAGTA R: TCGACCTGACATACGAGCTA	159	7	polimórfico
PiG11	(TC) ₂₆	F: TGCTATTTATCAAGCGTGGG R: TACAATCTGCAGCCGTAAGA	156	9	polimórfico
Pi1D	(TC) ₂₀	F: TCGAGAAAGCTGATACCCTG R: CGGTAAGGATTGACGTTGTG	150	1	monomórfico
Pi2D	(TC) ₉	F: AATTGAGTGAATGCGTCACC R: TTTCTGCTATCCTCAGCAC	155	1	monomórfico
Pi2H	(TC) ₁₉	F: TTCTCACACTTTCACGCTG R: GCTGTTGTGTATCGTTGC	132	2	monomórfico
F=forward	R=reverse				

En estudios de caracterización de poblaciones de Ecuador con cuatro marcadores microsatélites mostraron que dos subgrupos principales de este patógeno se pueden distinguir dentro de la metapoblación *P. infestans sensu lato*. El primer subgrupo, incluyó los aislamientos del tipo de apareamiento A1 que se ajustan a la descripción de *P. infestans* recogida de la papa o el tomate y que presentan el linaje clonal EC-1 y US-1 respectivamente. El segundo subgrupo incluye el linaje EC-3, que infecta a la sección que infectan a la sección Anarrhichomenum y que son aislamientos obtenidos de *B. sanguinea*, *S. hispidum* y *S. quitoense* y poseen el tipo de apareamiento A2. Este subgrupo correspondería a una especie de *Phytophthora* estrechamente relacionada con *P. infestans* que ha sido reportada como *P. andina* por algunos autores (Kroon *et al.*, 2004). Y con características mucho más diversas que *P. infestans* (Oliva, 2009).

Recientes análisis filogenéticos usando secuencias nucleares y mitocondriales, rasgos morfológicos y preferencias de nicho, ubican a esta especie como un taxa hermano de *P. phaseoli*, *P. ipomoeae*, *P. infestans* y *P. mirabilis* dentro del linaje Ic y, aunque el origen de esta especie aun no es muy claro, es posible que *P. andina* haya evolucionado como consecuencia de hibridación interespecifica entre *P. infestans* y *P. mirabilis* (Kroon *et al.*, 2004; Blair, 2008; Gómez-Alpizar *et al.*, 2008). No obstante, aún está en cuestión la presencia real de una nueva especie dada la capacidad de realizar cruces interespecificos y la ausencia de un clado monofiletico respecto a las especies hermanas (Oliva *et al.*, 2010). Además se requiere de la realización del análisis de variabilidad genética que permita inferir conclusiones más acertadas sobre la alta diversidad genética entre las poblaciones estudiadas. Sin embargo en Ecuador se conoce que *P. andina* perteneciente al linaje clonal EC-3 es la especie que ataca los cultivos de tomate de árbol reportada por Ordoñez *et al.*, (2000), y encontrada por primera vez en Colombia por Gómez *et al.*, (2009) mediante el análisis de

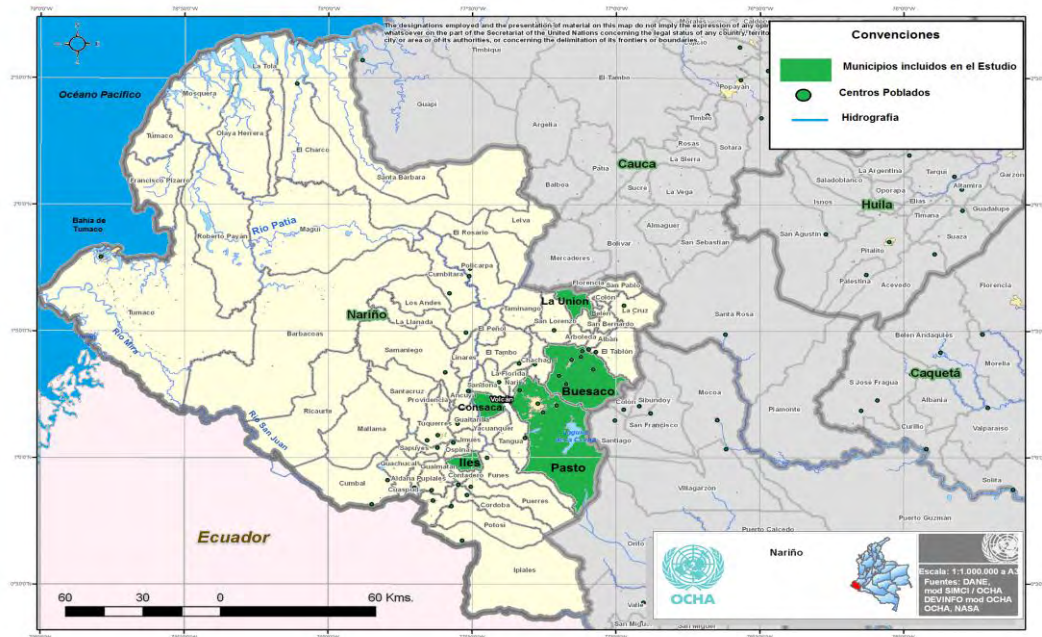
haplotipos mitocondriales de aislamientos procedentes de Nariño y obtenidos de plantas de tomate de árbol, presentándose el haplotipo mitocondrial la asociado al linaje clonal EC-3. Aunque este aspecto todavía no es claro, estas nuevas poblaciones del patógeno son altamente agresivas y presentan una amplia variabilidad genética a diferencia de las poblaciones de *P. infestans* encontradas en papa y tomate de mesa (Oliva *et al.*, 2010). Estudios con marcadores microsatélites (SSR) en Ecuador revelan la presencia de una alta diversidad en estas poblaciones encontrando un mayor número de alelos por locus en estas poblaciones (Oliva, 2009).

5. METODOLOGÍA

5.1 Localización del Área de Estudio

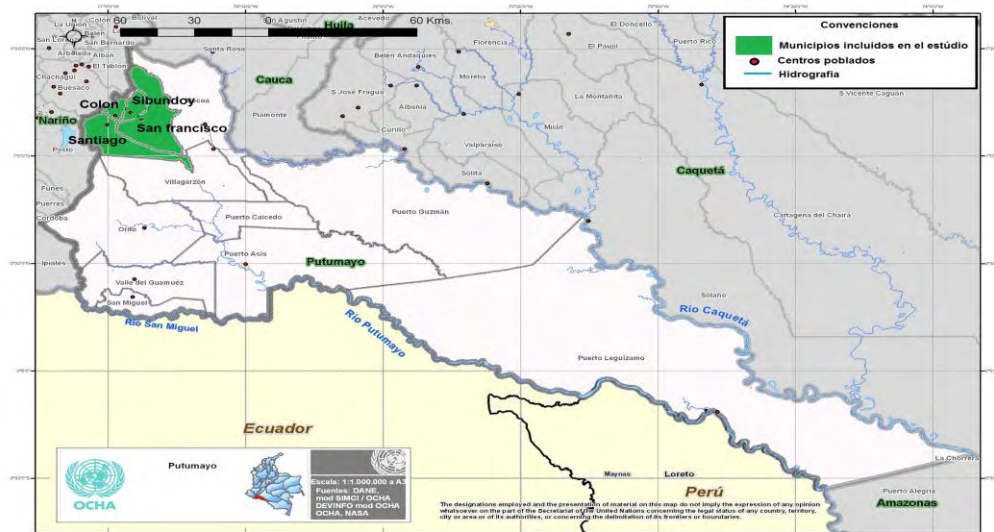
Las muestras de *P. infestans* fueron colectadas en los municipios de mayor impacto en la producción de tomate de árbol de los departamentos de Nariño y Putumayo. Los sitios de muestreo definidos en el departamento de Nariño fueron: Pasto (1°12'52.48" N, 77°16'41.22" O), La Unión (1° 26' 06" N, 77° 80' 15" O), Consacá (1° 12' 29" N, 77° 27' 57" O), Buesaco (1° 23' N, 77° 8' O) e Iles (0° 58' N, 77° 32' O) (Anexo B). En el departamento del Putumayo la zona específica de donde se obtuvo las muestras fue el Valle de Sibundoy, que comprende los municipios de Santiago (1.15'N 77.01'O), Colón (1.18'N 76.88'O), Sibundoy y San Francisco (1.18'N 76.88'O) (Anexo B), y se encuentran ubicados en la zona occidental del departamento, en límites con el departamento de Nariño (Opción Putumayo, 2007; GELT, 2009).

Figura 1. Localidades muestreadas en el Departamento de Nariño.



Fuente: mapa modificado de <http://www.colombiassh.org/site/>

Figura 2. Localidades muestreadas en el Departamento de Putumayo.



Fuente: mapa modificado de <http://www.colombiassh.org/site/>

5.2 Colección de Aislamientos

En el presente estudio se realizó la caracterización de 30 aislamientos, 15 correspondientes al Departamento de Nariño y 15 del Departamento del Putumayo. Las cepas actualmente se encuentran conservadas en agar tomate – arveja en el cepario del grupo Genética y Evolución de Organismos Tropicales – GENPAT de la Universidad de Nariño y fueron colectados entre 8 de septiembre de 2008 y 30 de Junio de 2009. Así mismo en el desarrollo de las pruebas moleculares se utilizó ADN de dos aislamientos provenientes del Ecuador y Perú como controles positivos y que previamente fueron caracterizados en el Centro Internacional de la Papa - CIP de Perú. Cada aislamiento cuenta con la información tomada en campo como código del cultivo, fecha de visita al cultivo, propietario del cultivo, localización geográfica, variedad del cultivo, entre otras (ver formato Anexo A).

5.3 Caracterización molecular de *P. infestans* mediante marcadores microsatélites.

5.3.1 Obtención de Micelio para extracción del ADN.

Los aislamientos de *P. infestans* fueron transferidos a medio líquido de caldo arveja e incubados a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 días. Cada aislamiento con su respectiva replica fueron filtrados (filtro miliporo) utilizando una bomba de vacío y almacenado en freezer a -20 °C hasta su procesamiento (Figura 3).

Figura 3. Obtención de micelio de *Phytophthora infestans* mediante filtración de cultivos sembrados en caldo arveja.



Fuente: esta investigación

5.3.2 Extracción del ADN.

Posteriormente se realizó la extracción de ADN a partir del micelio seco obtenido, siguiendo el *Protocolo de extracción Griffith y Shaw (1998)* que consistió en:

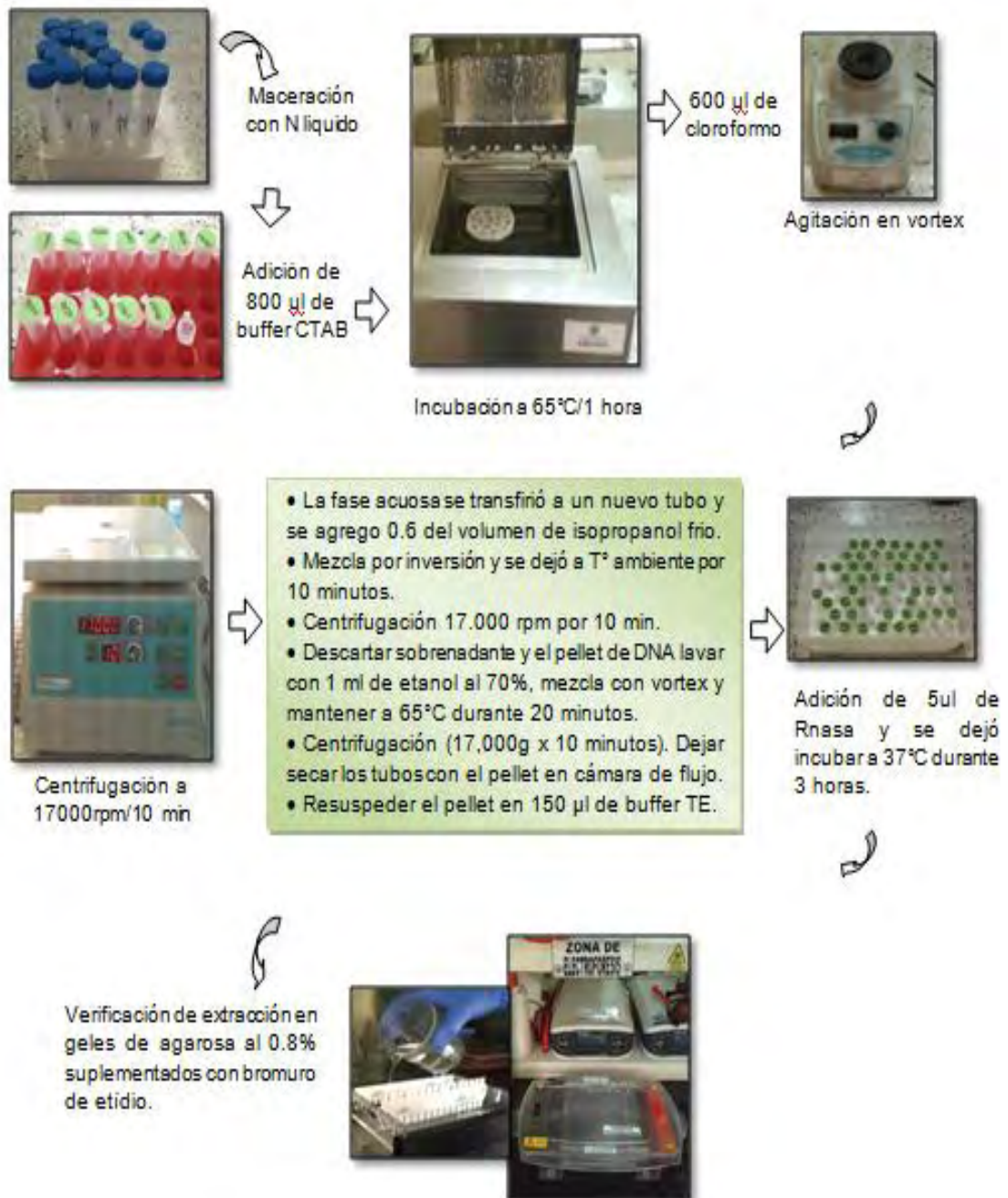
1. El micelio obtenido del medio de cultivo caldo arveja de cada uno de los aislamientos, se maceró con nitrógeno líquido, del macerado obtenido se pesaron aproximadamente 100 mg y se colocaron en tubos eppendorf para continuar con la extracción.

2. Se adicionaron 800 μ l de buffer CTAB (Tris HCl 100mM, NaCl 1.4M, EDTA 20mM pH 8.0; CTAB 2%), las muestras se agitaron mediante un vortex, y se incubaron a 65°C en baño María por 60 minutos.
3. Se adicionaron 600 μ l de cloroformo saturado en agua (1:1), se mezcló por 10 segundos y se centrifugó (17.000 g) por 10 minutos.
4. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se agregó 0.6 del volumen de isopropanol frío.
5. Cada tubo se mezcló por inversión y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. Transcurrido el tiempo las muestras se centrifugaron a 17.000 g por 10 min.
6. Se descarto el líquido sobrenadante y el pellet de ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70%, cada tubo se mezcló con vortex y se mantuvo en baño Maria a 65°C durante 20 minutos, y nuevamente las muestras se centrifugaron (17,000g x 10 minutos).
7. Se dejó secar los tubos con el pellet en cámara de flujo con el fin de remover las trazas de etanol y posteriormente se resuspendió el pellet en 150 μ l de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).
8. Para eliminar el contenido de RNA se adicionó 5ul de RNAsa (10mg/ml) y se dejó incubar a 37°C durante 3 horas.

Para verificar la extracción del ADN, las muestras se corrieron en geles de agarosa al 0.8% suplementados con bromuro de etidio, igualmente se determinó su concentración a partir de las comparación con Lambda ADN (stock de 50 μ g/ μ l).

El protocolo se esquematiza a continuación:

Figura 4. Protocolo de extracción de ADN de *Phytophthora infestans* descrito por Griffith y Shaw (1998).



Fuente: esta investigación

5.3.3 Caracterización molecular mediante marcadores microsatélites.

La caracterización molecular con marcadores microsatélites de los 30 aislamientos y de los dos controles positivos se realizó siguiendo el protocolo reportado por Knapova y Gisi, (2002) y Lees *et al.*, (2006), y cada una de las muestras fue amplificada con las siguientes secuencia de primers SSR.

Tabla 2. Secuencias de primers reportadas para la caracterización molecular de las poblaciones de *P. infestans* (Knapova y Gisi, 2002 y Lees *et al.*, 2006).

PRIMER	SECUENCIA
PI63	f:ATGACGAAGATGAAAGTGAGG
	r:ATTCATTATTGGCAATGTTGG
PI66	f:ACCGACAGCTTCTGAAACC
	r:AAAATAAGAAGAGATTCGTGCC
G11	f:TGCTATTTATCAAGCGTGGG
	r:TACAATCTGCAGCCGTAAGA
1F	f:CGAGAGTGAATGAGAGCGAG
	r:ACAATCTGCAGCCGTAAGAG
4B	f:AAAATAAAGCCTTTGGTTCA
	r:GCAAGCGAGGTTTGTAGATT
2D	f:AATTGAGTGAATGCGTCACC
	r:TTTCCTGCTATCCTCAGCAC

Para cada muestra las condiciones y temperaturas de amplificación fueron las siguientes:

Tabla 3. Condiciones y temperaturas de amplificación para marcadores microsatélites.

Reactivo	PI63	PI66	G11	1F	4B, 2D
Agua	1.6 µl	2.25 µl	1.5 µl	2 µl	1.5 µl
Buffer 10X	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
MgCl ₂ 25mM	1.4 µl	1.1 µl	1.4 µl	1.4 µl	1.4 µl
dNTPs 2.5mM	0.4 µl	0.2 µl	0.4 µl	0.2 µl	0.4 µl
Primers Fw y Rv 10uM	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.1 µl	0.2 µl
Taq 5U/µl	0.2 µl	0.25 µl	0.2 µl	0.2 µl	0.3 µl
ADN 5ng/µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Programa PCR	2 min 94°C 40 seg 94°C 40 seg 62°C 20 seg 72°C X 35 10 min 72°C 4°C	2 min 94°C 30 seg 94°C 30 seg 58°C 30 seg 72°C X 35 10 min 72°C 4°C	2 min 94°C 30 seg 94°C 30 seg 62°C 20 seg 72°C X 35 10 min 72°C 4°C	2 min 94°C 40 seg 94°C 40 seg 59°C 20 seg 72°C X 35 10 min 72°C 4°C	2 min 94°C 40 seg 94°C 40 seg 57°C 20 seg 72°C X 35 10 min 72°C 4°C

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las muestras amplificadas fueron mezcladas con 3 µl de *loading buffer* PAGE (11.2 mg Xylene Cyanol, 8.4 g Urea, 14 ml de H₂O) y denaturadas a 95°C durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se mantuvieron en hielo hasta llevarse a electroforesis vertical utilizando poliacrilamida 6% (20:1, acrilamida: bisacrilamida, Urea 7,5 M, TBE 10X), se cargó cada muestra en los pozos y se corrió durante 1 hora 30 minutos con un voltaje de 1500 V-300W 80mA, y el marcador de peso utilizado fue de 100 pb. Una vez

las muestras se corrieron teniendo en cuenta los tiempos especificados en la tabla anterior, se realizó la tinción con Nitrato de plata. (Centro Internacional de la Papa - CIP, 2000) (Tabla 4).

Tabla 4. Protocolo de tinción nitrato de plata. (CIP, 2000)

SOLUCIÓN	TIEMPO
Solución de fijación: Acido acético 10%	20 minutos.
Tres lavados con agua destilada.	2 minutos cada uno
Reducción de Background: Acido Nítrico 1%	durante 1 o 2 minutos
Tres lavados con agua destilada.	2 minutos cada lavado
Solución de Tinción: Nitrato de plata y Formaldehido	40 minutos
Un lavado con agua destilada	15 segundos
Solución de revelado: Carbonato de Sodio, tiosulfato de sodio (10mg/ml) y formaldehido.	Hasta observar la formación de bandas
Solución stop: Acido acético 10%	Solución final

Este procedimiento completo se esquematiza a continuación en la Figura 5.

Figura 5. Montaje, corrida y tinción de Gel de Poliacrilamida.



Fuente: esta investigación

5.3.4 Análisis Estadístico.

Análisis de marcadores moleculares microsatélites.

Los datos obtenidos (alelos) en cada gel para los 30 aislamientos de *P. infestans* con cada microsatélite fueron evaluados y cuantificados visualmente mediante la comparación con el marcador de peso utilizado.

Para analizar la variabilidad genética y calcular los siguientes parámetros de diversidad genética: Frecuencia alélica de cada locus por población, índice de diversidad de Shannon (I), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), porcentaje de loci polimórficos por población, alelos únicos por población, distancia e identidad genética de Nei y análisis de varianza molecular (AMOVA), los datos se organizaron en una matriz utilizando el programa Microsoft Excel 2010, para ser analizados en el programa GENALEX 6.5 (Peakall, 2012). Para el análisis de estos parámetros los aislamientos se dividieron en dos poblaciones dependiendo de la zona biogeográfica de donde fueron obtenidos, en este caso la población de *P. infestans* de Putumayo y la población de *P. infestans* de Nariño cada una con un número total de 15 aislamientos, y se consideraron los microsatélites PI63, G11, PI66, F1 y 2D, el locus 4B por poseer más de 4 alelos por individuo, dificultó el análisis y por tanto fue excluido.

A partir de los patrones de bandas obtenidos en los geles se codificó la información alélica en una matriz de ausencia y presencia de bandas a la que se le aplicó el método de agrupamiento UPGMA (del inglés Unweighted pair-group arithmetic mean), utilizando el coeficiente de Similaridad de Dice que es el más usado y el que produce menor distorsión al compararse con la matriz original de similaridad, utilizando el programa NTSYS-pc versión 2.11. Para corroborar el número de grupos obtenidos en el UPGMA se realizó diferentes modelos de mezcla de la población asumiendo independencia y correlación entre los alelos utilizando el software STRUCTURE 2.0; y para el análisis de la estructura intrapoblacional se realizó en el programa ARLEQUIN un diagrama mínimo de redes (Goss *et al.*, 2009).

Distribución Geográfica.

Para conocer la distribución de los aislamientos estudiados, inicialmente se realizó la georeferenciación utilizando las coordenadas geográficas del lugar de donde se aislaron, posteriormente se elaboró un mapa en el programa ArcGIS 9.1, utilizando planchas topográficas (código PI430) de la zona de estudio donde se encontraba la base cartográfica como principales ríos, algunas quebradas, curvas de nivel y toponimia, y finalmente cada uno de los puntos de muestreo fue ubicado en el mapa. Esta distribución espacial de los puntos fue relacionada con los resultados del análisis UPGMA, demarcando cada punto con el grupo que correspondía en el UPGMA.

6. RESULTADOS

6.1 Aislamientos

En este trabajo se caracterizados 30 aislamientos de *P. infestans*, depositados en la colección del cepario del Grupo de Investigación Genética y Evolución de Organismos Tropicales – GENPAT de la Universidad de Nariño (Tabla 5 y Anexo B).

Tabla 5. Aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes de los Departamento de Nariño y Putumayo utilizados en el estudio de la caracterización genética.

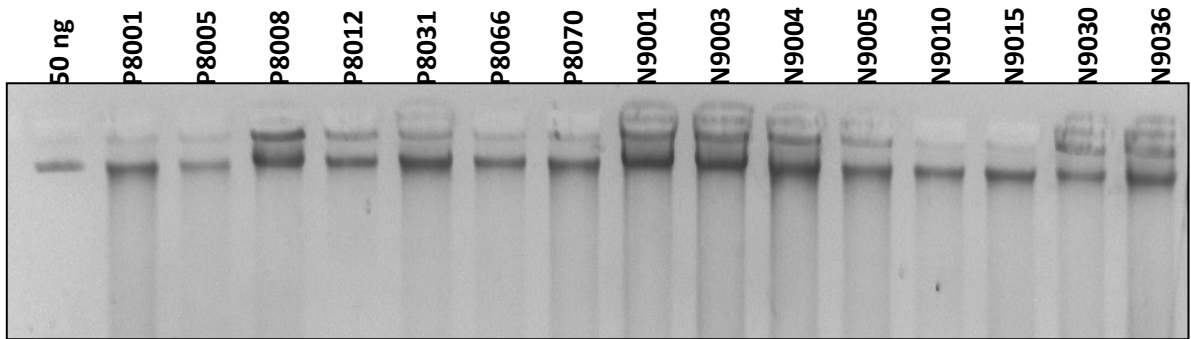
Aislamiento	Departamento	Municipio	Hospedante	TA	Haplotipo mitocondrial
N9001	Nariño	Buesaco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9003	Nariño	Buesaco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9004	Nariño	Buesaco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9005	Nariño	Buesaco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9010	Nariño	Buesaco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9015	Nariño	Buesaco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9030	Nariño	Buesaco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9036	Nariño	Buesaco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9046	Nariño	Pasto	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9056	Nariño	Consacá	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9057	Nariño	Consacá	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9065	Nariño	Iles	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9071	Nariño	La unión	<i>S. betaceum</i>	A1	la

N9072	Nariño	La unión	<i>S. betaceum</i>	A1	la
N9073	Nariño	Pasto	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8001	Putumayo	Santiago	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8005	Putumayo	Santiago	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8008	Putumayo	Santiago	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8012	Putumayo	Colon	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8031	Putumayo	Santiago	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8066	Putumayo	Santiago	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8070	Putumayo	Colon	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8075	Putumayo	Colon	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8087	Putumayo	San Francisco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8093	Putumayo	San Francisco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P8098	Putumayo	San Francisco	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P9128	Putumayo	Sibundoy	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P9158	Putumayo	Sibundoy	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P9159	Putumayo	Sibundoy	<i>S. betaceum</i>	A1	la
P9164	Putumayo	Sibundoy	<i>S. betaceum</i>	A1	la
PPI014	Perú	CIP- Control	<i>S. tuberosum</i>		lla
3210	Ecuador	CIP- Control	<i>S. betaceum</i>		la

6.2 Extracción de ADN

Los resultados obtenidos del proceso de extracción siguiendo el protocolo propuesto por Griffith y Shaw (1998), a partir de micelio previamente filtrado y secado, mostraron buenos resultados, obteniéndose una concentración de ADN que superó el lambda de 50 ng utilizado como referencia, estos resultados fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8 % (Fig. 6). Fue necesario realizar una dilución para obtener ADN a una concentración de 5 ng la requerida para realizar las posteriores amplificaciones.

Figura 6. Extracción de ADN de *Phytophthora infestans*.



Fuente: esta investigación

6.3 Caracterización molecular de *P. infestans* mediante marcadores Microsatélites.

Amplificaciones.

Los 6 loci se amplificaron en la totalidad de los aislamientos de *P. infestans* procedentes de los departamentos de Nariño y Putumayo, sin embargo hubo dificultades en la amplificación de los loci de los controles y de los aislamientos N9015 y N9071 que pueden ser debidas a la baja calidad del ADN extraído para estas muestras. Los patrones generados por los marcadores microsatélites en los 30 aislamientos de *P. infestans* y los 2 controles (Ppi014, 3210), usando los 6 locus (Pi63, Pi66, G11, 1F, 4B y 2D); mostraron alto polimorfismo, encontrándose más de dos alelos en un locus.

Sin embargo el patrón de bandas observado entre los aislamientos fue homogéneo, y se encontraron diferencias con el aislamiento utilizado como control positivo procedente de Ecuador y el aislamiento obtenido de *S. tuberosum*. Las figuras 1 a 6 muestran los patrones de bandas de ADN obtenidos de cada uno de los aislamientos con los 6 primer utilizados en este estudio. Las figuras que se muestran a continuación son fuente de esta investigación.

Figura 7. Amplificación con Microsatélite 2D de 15 aislamientos de *P. infestans* provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).

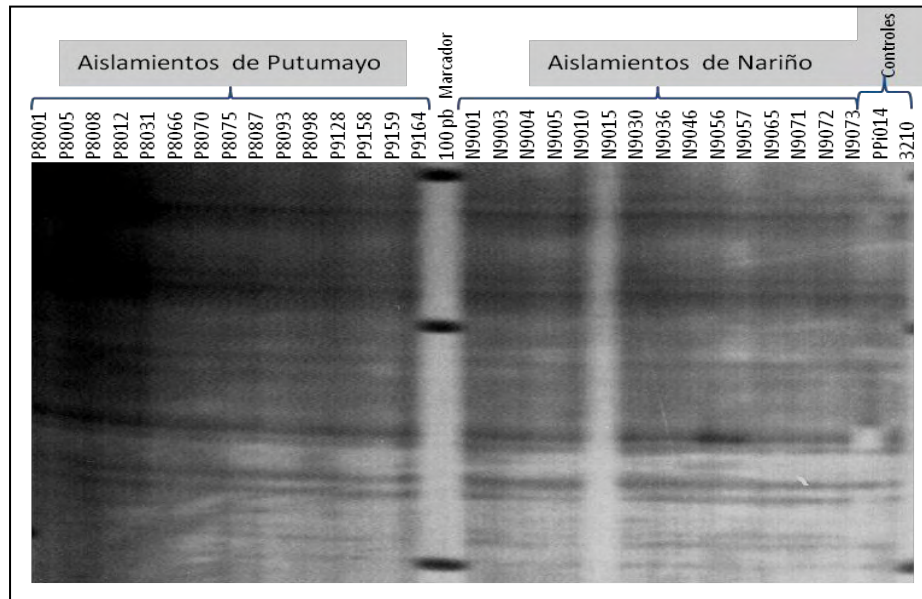


Figura 8. Amplificación con Microsatélite PI63 de 15 aislamientos de *P. infestans* provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).

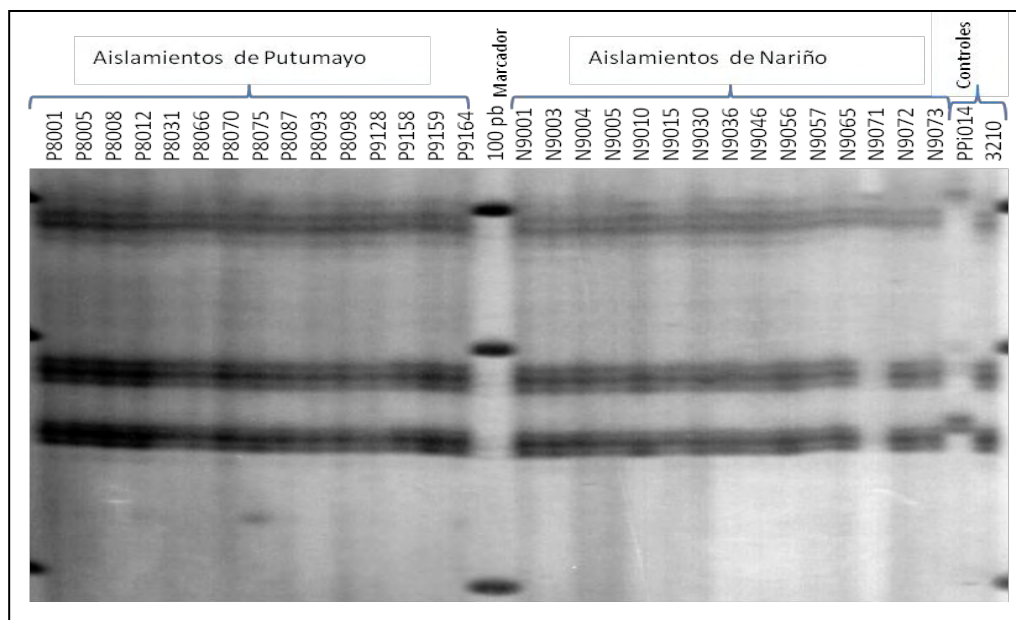


Figura 9. Amplificación con Microsatélite 4B de 15 aislamientos de *P. infestans* provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).

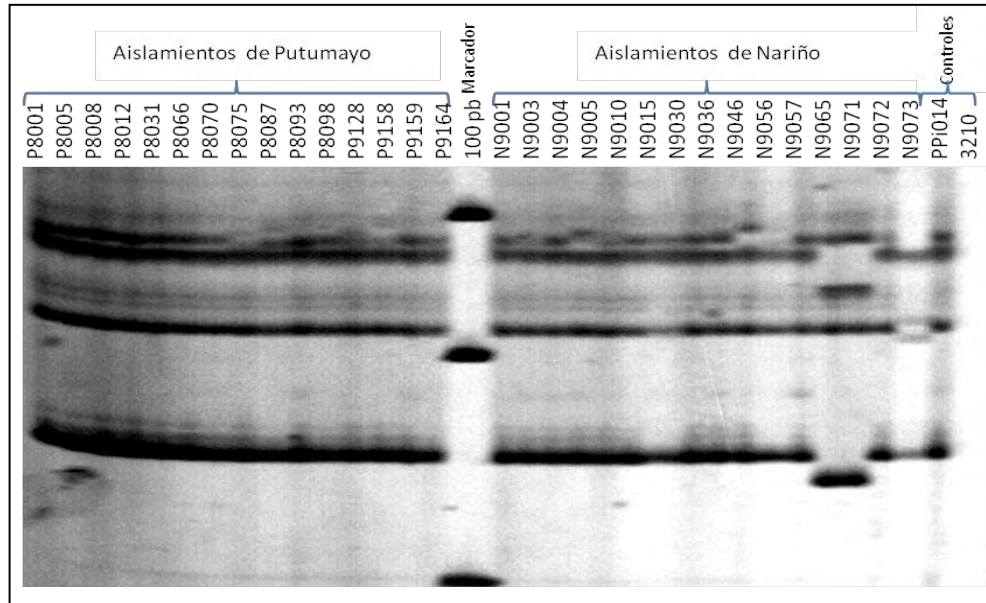


Figura 10. Amplificación con Microsatélite G11 de 15 aislamientos de *P. infestans* provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).

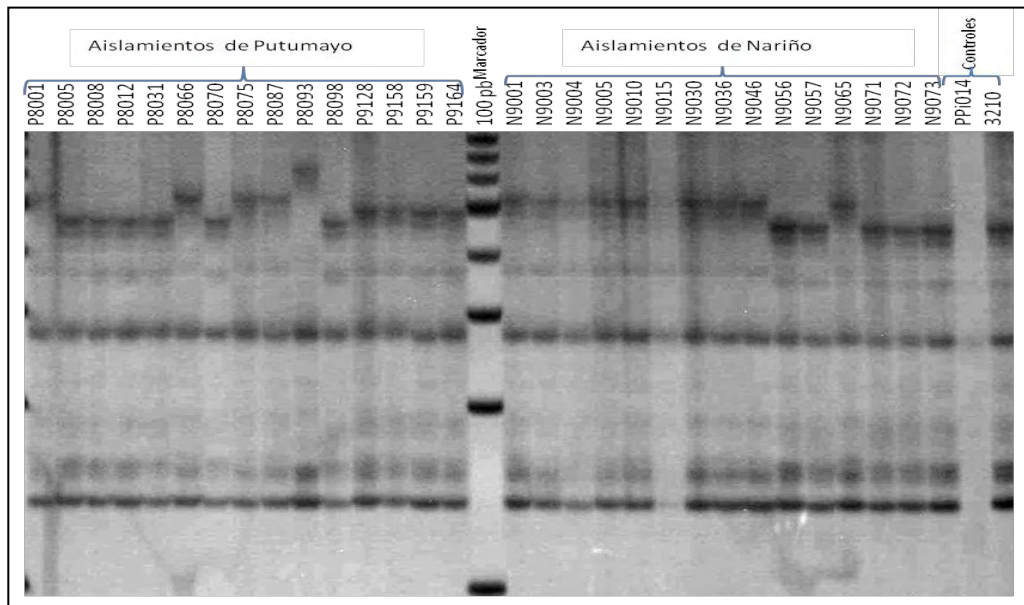


Figura 11. Amplificación con Microsatélite PI66 de 15 aislamientos de *P. infestans* provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).

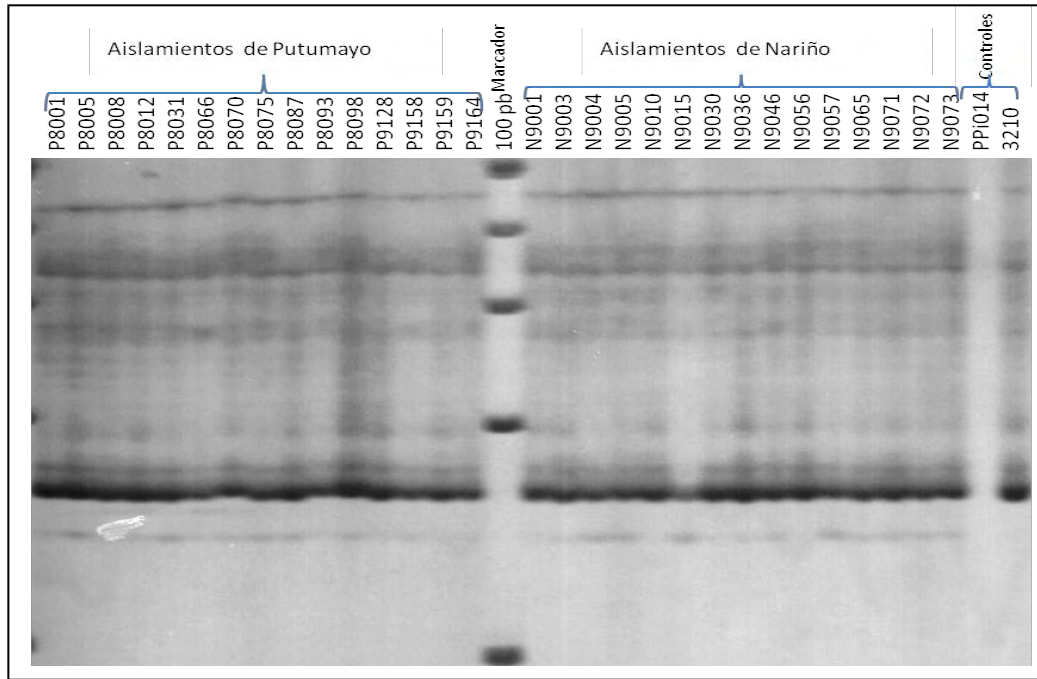
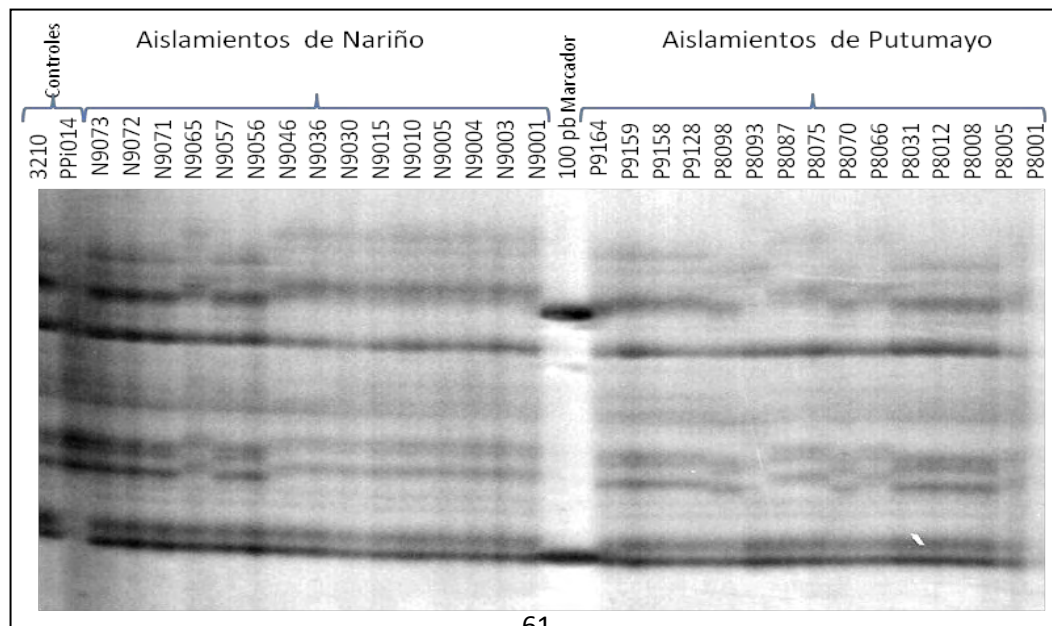


Figura 12. Amplificación con Microsatélite F1 de 15 aislamientos de *P. infestans* provenientes de Putumayo (P8001-P9164), 15 aislamientos de Nariño (N9001- N9073) y controles (PPi014 y 3210).



A partir de los patrones electroforéticos generados con cada uno de los seis marcadores evaluados, se identificó un total de 24 alelos con un promedio de 4 alelos por marcador, que correspondieron a amplicones con tamaños entre 96 y 278 pb. Para todos los aislamientos caracterizados y los controles, el mayor número de alelos fue revelado por los marcadores 4B y G11 que amplificaron 7 y 5 alelos respectivamente, mientras que el marcador 2D amplificó el menor número de alelos, únicamente 2. Los marcadores, PI66 y PI63 amplificaron 3 cada uno y el marcador 1F 4 alelos (Tabla 6). Por tanto los 6 marcadores SSR analizados en esta caracterización fueron polimórficos, presentándose más de un alelo por cada locus.

Tabla 6. Alelos obtenidos en cada uno de los aislamientos de *Phytophthora infestans*. con los 6 locus analizados expresados en pares de bases (pb).

Aislamiento	Locus PI63		Locus G11		Locus PI66		Locus F1		Locus 2D		Locus 4B			
P8001	148	151	130	160	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P8005	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P8008	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P8012	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P8031	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P8066	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	273
P8070	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P8075	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	
P8087	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	273
P8093	148	151	130	166	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P8098	148	151	130	156	230		96	118	146	154	213	253	270	273
P9128	148	151	130	158	230	241	96	120	146	154	213	253	270	273
P9158	148	151	130	158	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P9159	148	151	130	158	230		96	120	146	154	213	253	270	273
P9164	148	151	130	158	230		96	120	146	154	213	253	270	273
N9001	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	273
N9003	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	273
N9004	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	273
N9005	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	278

N9010	148	151	130	160	230	241	96	122	146	154	213	253	270	273
N9015	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	273
N9030	148	151	130	160	230	241	96	122	146	154	213	253	270	273
N9036	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	273
N9046	148	151	130	160	230		96	122	146	154	213	253	270	273
N9056	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	278
N9057	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	
N9065	148	151	130	160	235	230	96	122	146	154	213	253	270	273
N9071	148	151	130	156	235	230	96	120	146	154	206	253	257	273
N9072	148	151	130	156	230		96	120	146	154	206	253	257	273
N9073	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	273
PPi014	157							120		154	213	270		
3210	148	151	130	156	230		96	120	146	154	213	253	270	273
Total alelos/locus	3		5		3		4		2		7			

6.4 Análisis de diversidad genética

En este estudio se calculó las frecuencias de los distintos alelos por cada población incluida en el análisis, las frecuencias de los alelos 148 y 151 correspondientes al locus PI63 y las de los alelos 146 y 154 del locus 2D mostraron frecuencias similares (0.5) en las dos poblaciones. Las frecuencias de los 5 alelos obtenidos con el locus G11 se distribuyeron de manera diferente en las poblaciones, siendo en Putumayo donde se encontraron todos los alelos, el alelo 130 presentó la mayor frecuencia (0.5) seguido de 156 con 0.2, luego los alelos 158 y 160 con 0,133 y la menor frecuencia se observó en el alelo 166, hay que destacar que los alelos 158 y 166 son alelos únicos para esta población y por lo tanto sus frecuencias son bajas; para Nariño se encontraron 3 de los 5 alelos del locus G11, el 130 que presentó mayor frecuencia (0.5), el 160 con 0.333 y la menor frecuencia para el alelo 156 con 0.167. (Tabla 7, Fig. 13)

Con el locus PI66 se encontraron 3 alelos, para Putumayo los alelos 230 y 241 cada uno con similar frecuencia (0.5), y en Nariño se encontraron los 3 alelos, el alelos 230 con frecuencia de 0.5, el 241 con 0.25 y el 235 siendo un alelo único de esta población con frecuencia de 0.25. El Locus F1 amplificó 4 alelos, encontrándose en su totalidad en Putumayo y 3 en Nariño, en Putumayo las frecuencias se distribuyeron de la siguiente manera, la mayor para el locus 96 con 0.5 seguida del alelos 120 con 0.367, luego el 122 con 0.1 y la menor para el alelo 118 con 0.033 siendo único de esta población, en Nariño el alelo 96 también presentó la mayor frecuencia (0.5), seguido de 122 con 0.333 y la menor para el alelo 120 con 0.167. (Tabla 7, Fig. 13).

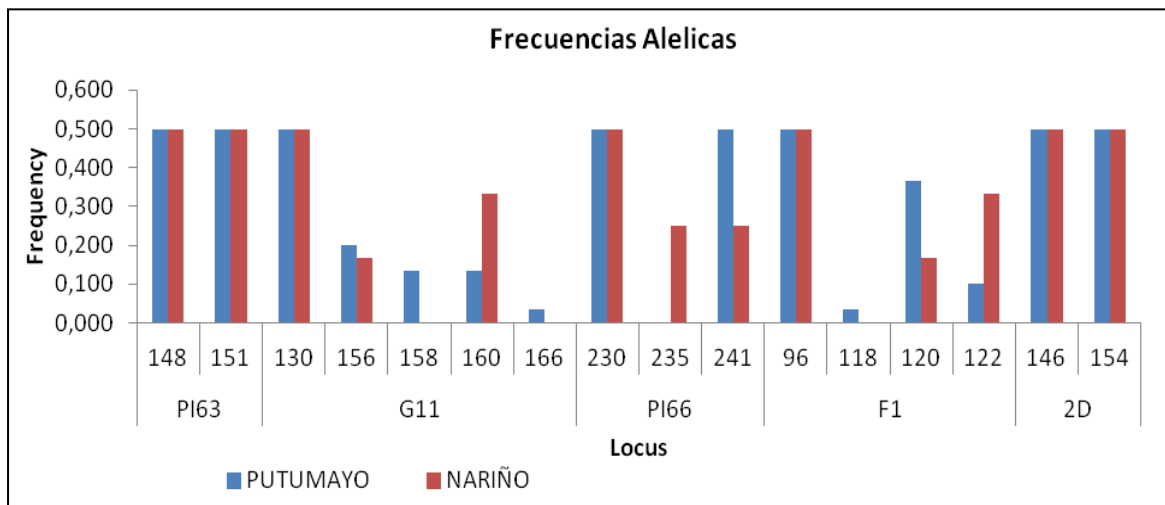
Las menores frecuencias detectadas corresponden con alelos únicos presentes exclusivamente en uno o dos aislamientos de la población, siendo alelos de gran interés ya que pueden servir de marcadores específicos de aislamientos determinados.

Tabla 7. Frecuencia de los alelos encontrados con 5 marcadores microsatélites en las poblaciones de *P. infestans* estudiadas.

Locus	Alelos	PUTUMAYO	NARIÑO
PI63	148	0.5	0.5
	151	0.5	0.5
G11	130	0.5	0.5
	156	0.2	0.167
	158	0.133	0
	160	0.133	0.333
	166	0.033	0
PI66	230	0.5	0.5
	235	0	0.25

	241	0.5	0.25
F1	96	0.5	0.5
	118	0.033	0
	120	0.367	0.167
	122	0.1	0.333
2D	146	0.5	0.5
	154	0.5	0.5

Figura 13. Distribución de las frecuencias alélicas encontradas con 5 locus microsatélites en las poblaciones de *P. infestans* de Putumayo y Nariño.



Fuente: esta investigación

La heterocigosidad observada en este estudio fue alta con un valor promedio de 1 en las dos poblaciones de estudio (Putumayo y Nariño), así mismo en comparación con la Heterocigosidad esperada estos valores son muy elevados, esperándose encontrar una heterocigosidad de 0.556 y 0.569 para Putumayo y Nariño respectivamente, puede deberse a que los locus evaluados en cada población presentaron igualmente un polimorfismo de

100% para las dos, siendo la heterocigosidad observada directamente proporcional a estos valores (Tabla 8).

El promedio de la diversidad genética usando el índice de Shannon (I) fue de 0.891, siendo la población de *P. infestans* de Putumayo la que mostró una mayor diversidad (0.891) en comparación con Nariño (0.890), sin embargo el valor de la diferencia no es significativo (Tabla 8.).

Tabla 8. Loci polimórficos (%), Índice de diversidad de Shannon (I), Heterocigosidad observada (Ho), y Heterocigosidad esperada (He) identificados dentro de la colección de *P. infestans* de Putumayo y Nariño.

Población	Loci Polimórficos (%)	I	Ho	He
PUTUMAYO	100%	0.891	1.000	0.556
NARIÑO	100%	0.890	1.000	0.569
Promedio	100%	0.891	1.000	0.563

I = Índice de Shannon = $-1 * \sum (p_i * \ln(p_i))$

Ho = Heterocigosidad Observada = No. of Hets / N

He = Heterocigosidad Esperada = $1 - \sum p_i^2$

La determinación de alelos únicos demostró que con los locus G11, F1 y PI66 se obtuvieron cuatro alelos únicos para las poblaciones de estudio (Tabla 9). En las poblaciones del Putumayo se identificó tres de estos, el 158 que presentó mayor frecuencia, el 166 y el 118 que tienen igual frecuencia, y en Nariño se identificó con el Locus PI66 el alelo 235 con una frecuencia de 0.25, superior a las frecuencias de los alelos únicos de Putumayo.

Tabla 9. Alelos únicos por población de *P. infestans*.

Población	Locus	Alelo	Frecuencia
PUTUMAYO	G11	158	0.133
PUTUMAYO	G11	166	0.033
PUTUMAYO	F1	118	0.033
NARIÑO	PI66	235	0.250

La identidad genética obtenida entre las dos poblaciones fue alta con un valor de 0.936, en consecuencia la distancia genética (GD) fue entre Putumayo y Nariño (GD= 0.066 (Tabla 10).

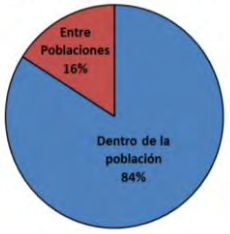
Tabla 10. Identidad genética (GI) y distancia genética (GD) calculadas según Nei (1978) para las poblaciones de Nariño y Putumayo identificados dentro de la colección de *P. infestans* de Putumayo y Nariño.

PUTUMAYO	NARIÑO	POBLACIÓN
****	0.936	PUTUMAYO
0.066	****	NARIÑO

Por encima de la diagonal se lee la identidad genética (GI), por debajo de la diagonal se lee la distancia (GD).

El análisis de diversidad genética a partir de los resultados moleculares obtenidos con marcadores microsatélites demuestran que *P. infestans* es un patógeno que presenta una alta variabilidad genotípica, el 84% de la diversidad genética se atribuye a la variación dentro de las poblaciones estudiadas en comparación con el 16 % de variación entre las dos poblaciones (Tabla 11).

Tabla .11 Análisis de varianza molecular (AMOVA) para el análisis de 30 aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de tomate de árbol (*S. betaceum*) en los Departamentos de Nariño y Putumayo, mediante marcadores Microsatélites.

	Fuente de variación	df	SS	MS	Var. Est.	%D
	Entre Poblaciones	1	2.567	2.567	0.126	16%
	Dentro de Poblaciones	28	19.133	0.683	0.683	84%
	Total	29	21.700		0.809	100%

Estadísticos Incluidos: df, grados de libertad; SS, suma de cuadrados; MS, cuadrados medios; Est. var, varianza estimada; % D, distribución de la varianza total.

6.5 Análisis de similaridad genética y agrupamientos

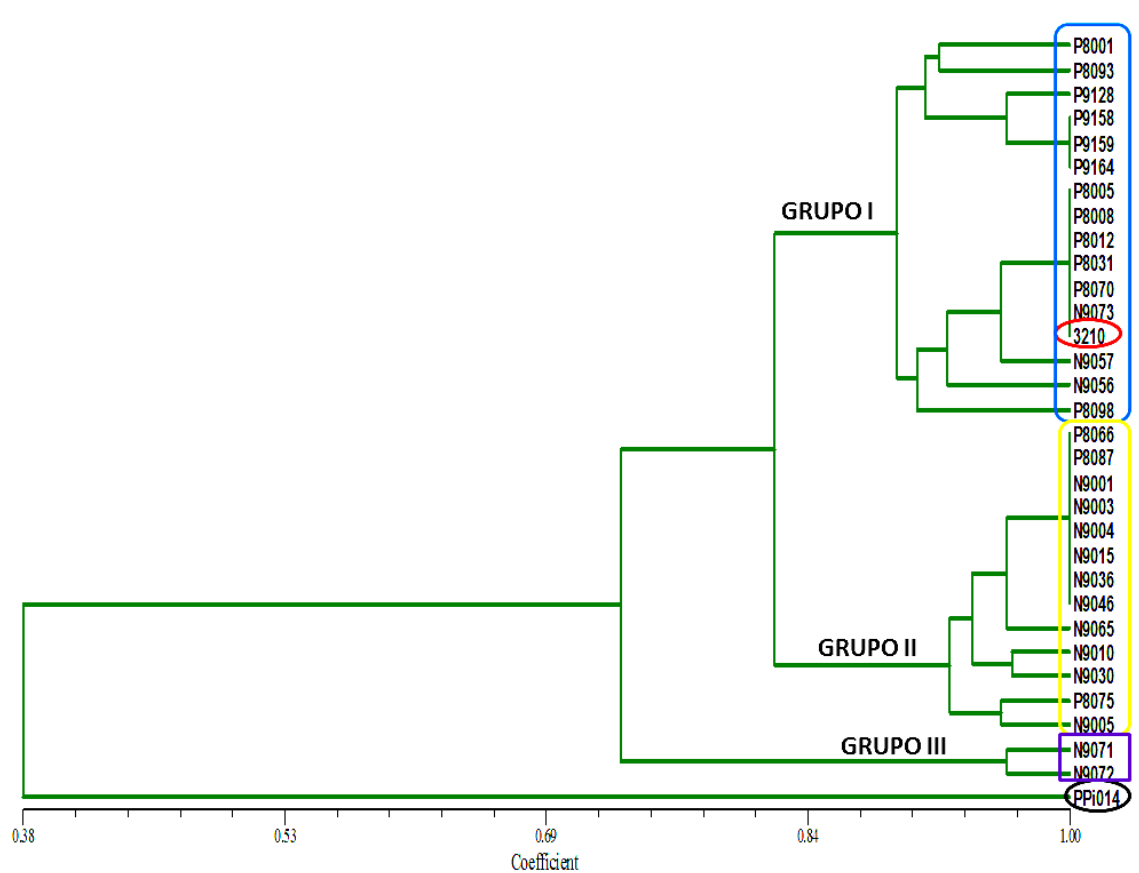
El dendrograma UPGMA (Figura 14), permitió identificar los aislamientos iguales dentro de la colección puesto que tenían un coeficiente de similaridad igual a 1.00 (100 % de similaridad). El control PPI014 obtenido de *S. tuberosum* de Perú es lo suficientemente disimilar como para ser usado en la comparación con los demás.

El Coeficiente de Correlación Cofenética un $r = 0,96$ muestra que existe una estrecha relación entre la matriz de distancia y la matriz cofenética.

El dendrograma generado asoció los 32 aislamientos en tres grupos con valores de similitud mayores a 0.90. En el Grupo I se encuentran la gran mayoría de los aislamientos (12 aislamientos) procedentes del Departamento de Putumayo, y tres aislamientos procedentes del Departamento de Nariño, así mismo dentro de este grupo se encuentra el aislamiento control (3210)

que es aislado de *S. betaceum* de Ecuador. El Grupo II está compuesto por 10 aislamientos de Nariño y 3 aislamientos de Putumayo; y el Grupo III en el que solamente se encuentran 2 aislamientos de Nariño. Este último grupo comparte un valor de similitud de 0.75 con los grupos I y II que tienen una similitud de 0.82. Hay que destacar que estos tres grupos contienen todos los aislamientos obtenidos de *S. betaceum* y se diferencian claramente del aislamiento PPI014 obtenido de *S. tuberosum* ya que su valor de similitud (0.38) es muy bajo.

Figura 14. Dendrograma generado a partir del análisis con seis cebadores microsatélites en una población de 30 aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes de Nariño y Putumayo.



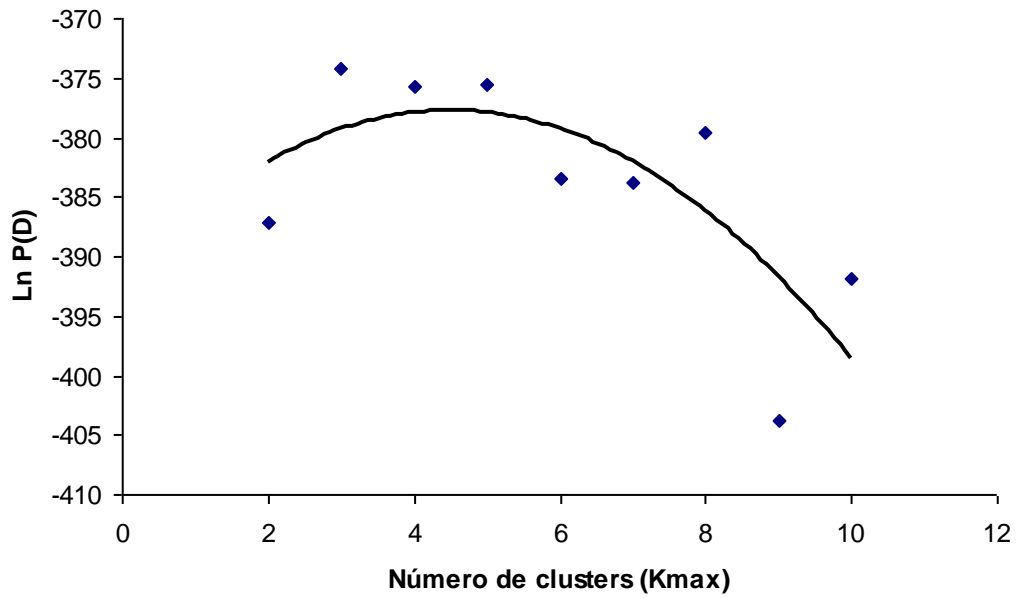
Fuente: esta investigación

Análisis de Estructura de Poblaciones.

Los microsatélites fueron analizados usando el software STRUCTURE 2.0 con el objetivo de determinar en cuantos grupos o clusters al interior de la población pueden clasificarse los individuos. El análisis bajo diferentes modelos de mezcla de la población asumiendo independencia y correlación entre los alelos reveló que si existen clusters dentro de la población, y estos se limitan a dos; entre los modelos evaluados se escogió el de independencia para cada alelo con índices alfa calculados para cada población. La figura 15, muestra que existe un valor estacionario para el número de clusters a partir de 2, bajo esta consideración se deriva que el menor valor del número de clusters es el que mejor representa la población.

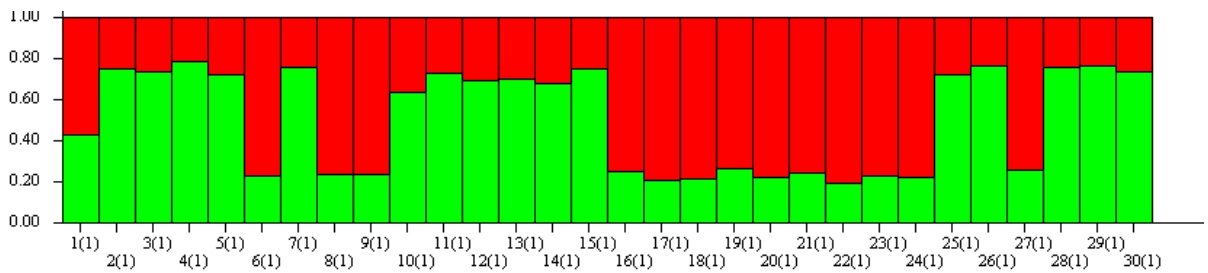
La figura 16 muestra para cada individuo su porcentaje de mezcla en consideración a los dos clusters determinados para la población. Otra de las premisas para evaluar la fiabilidad del modelo usado para la determinación de la estructura es si esta permite separar claramente individuos de un clúster respecto a otro, es así que los individuos 16 a 24 pertenecen al clúster 2, mientras los individuos de 2 a 5 pertenecen al clúster 1, en ambos casos presentan proporciones considerables de mezcla con el otro clúster considerado (alrededor del 20%) (Figura 16).

Figura 15. Número estimado de Grupos para las dos poblaciones de Nariño y Putumayo.



Fuente: esta investigación

Figura 16. Porcentaje de mezcla de cada aislamiento en consideración a los Grupos.



Fuente: esta investigación

Análisis a nivel intrapoblacional

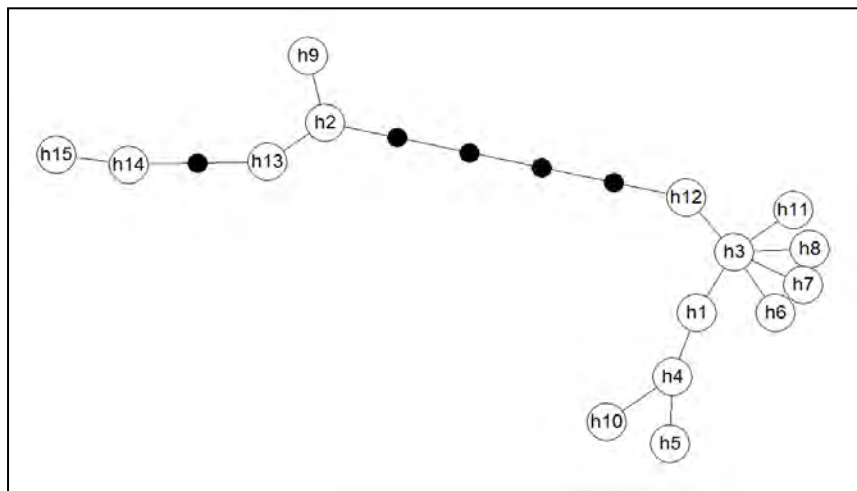
El análisis intrapoblacional generó 15 haplotipos los cuales contienen los mismos marcadores (Tabla 12), con estos se construyó una red de expansión mínima (Schneider *et al.*, 2000) con el fin de visualizar las relaciones filogenéticas entre los diferentes haplotipos generados (Figura 17), cada círculo representa un haplotipo.

Tabla .12 Haplotipos encontrados en el análisis de 30 aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de tomate de árbol (*S. betaceum*) en los Departamentos de Nariño y Putumayo, mediante marcadores Microsatélites.

Haplotipo	marcadores
h1	148 160 230 120 154 253 273
h2	151 130 230 96 146 213 270
h3	148 156 230 120 154 253 273
h4	148 160 230 122 154 253 273
h5	148 160 230 122 154 253 270
h6	148 166 230 120 154 253 273
h7	148 156 230 118 154 253 273
h8	148 158 230 120 154 253 273
h9	151 130 241 96 146 213 270
h10	148 160 230 122 154 253 278
h11	148 156 230 120 154 253 278
h12	148 156 230 120 154 253 270
h13	151 130 235 96 146 213 270
h14	151 130 235 96 146 206 257
h15	151 130 230 96 146 206 257

Figura 17. Red mínima de expansión de las poblaciones.

La red de haplotipo generada muestra los haplotipos que son representados por un círculo, y donde cada línea entre los puntos representa un solo paso mutacional.

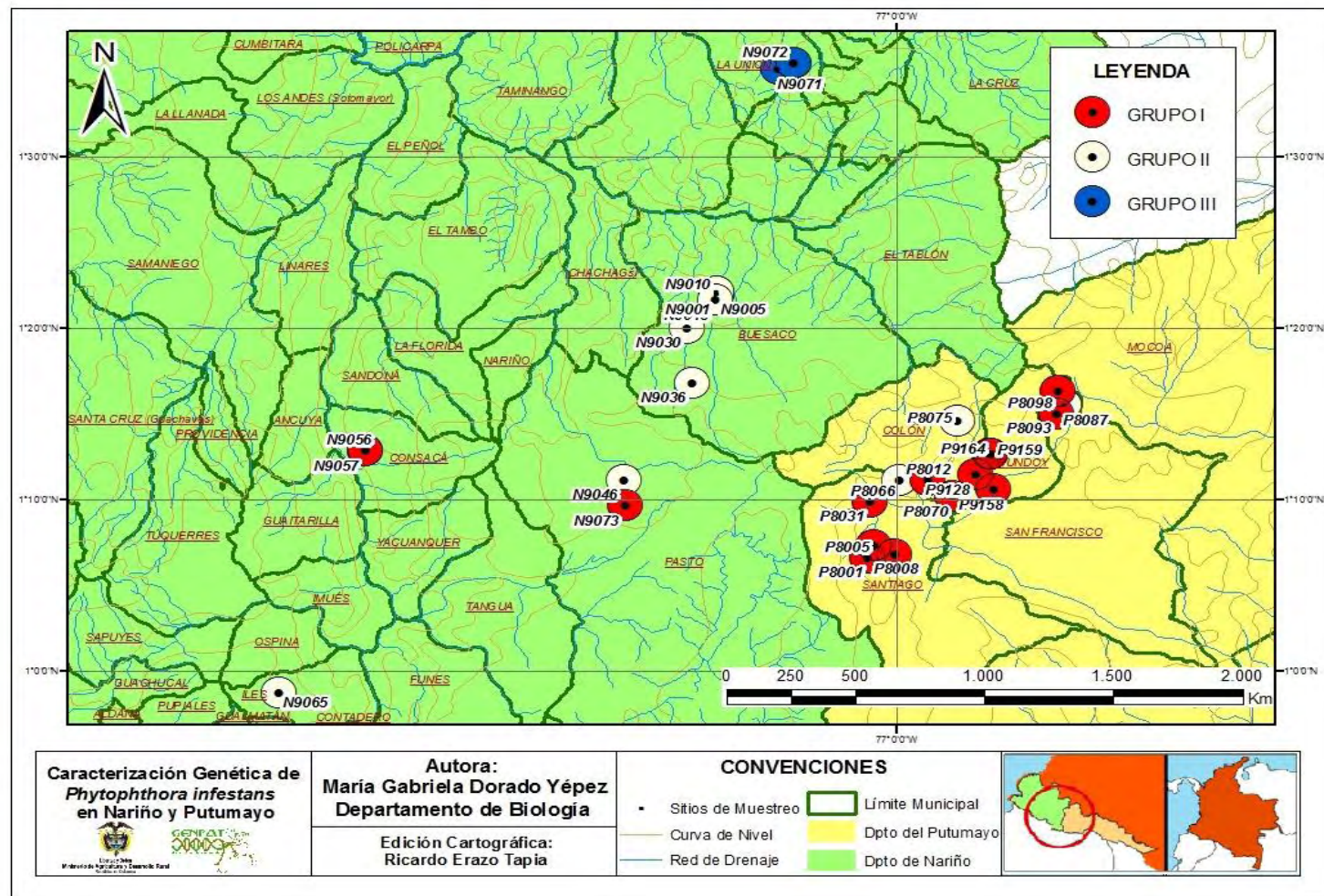


Fuente: esta investigación

6.4 Distribución Geográfica

Cada uno de los puntos de muestreo está ubicado en un mapa con el fin de conocer la distribución, y así mismo cada uno está identificado con un color según el grupo en el que fue asociado en el análisis de similitud representado por el UPGMA.

Figura 18. Distribución geográfica de los aislamientos caracterizados en este estudio.



7. DISCUSIÓN

7.1. Análisis de diversidad genética

En el análisis de los datos obtenidos en esta caracterización se obtuvo con la mayoría de los locus analizados la presencia de dos bandas por aislamiento, con excepción del locus 4B en el que se observó la presencia de 3 o 4 bandas por aislamiento. Este locus fue excluido del análisis de diversidad genética en consideración a que los programas utilizados en el análisis de marcadores codominantes aceptan únicamente datos de organismos haploides y diploides; sin embargo fue incluido en el análisis de agrupamiento.

En estudios previos de caracterización de poblaciones de *P. infestans* también se encontraron resultados similares a los de este trabajo, como es el caso de Knapova y Gisi (2002) donde desarrollaron tres marcadores SSR polimórficos con los cuales analizaron aislamientos de *P. infestans* procedentes de papa y tomate en Francia y Suiza. El trabajo demostró que en dos loci (incluyendo el loci Pi4B también utilizado en este estudio), se observó un total de 10 alelos diferentes en las poblaciones de *P. infestans*. Por tanto estos autores sugirieron que la recombinación sexual y la selección en lugar de migraciones de larga distancia pueden explicar esta diversidad.

Así mismo Lees *et al.*, (2006) desarrolló 12 marcadores microsatélites para el monitoreo de una población de 90 aislamientos de *P. infestans* en el Reino Unido y otros países, encontraron que los marcadores Pi63 y 4B generaron tres bandas cuando se utilizaron para amplificar una de las cepas control.

Sin embargo estos datos fueron atípicos en los 90 aislamientos de *P. infestans* de la prueba, y por tanto si se incluyeron en el análisis. En el caso de los marcadores Pi26 y Pi65 que también generaron de tres a cuatro bandas no se consideraron adecuados para su uso en el análisis de la población y no se incluyeron en el análisis final. Los autores consideran que esto puede resultar en una ligera subestimación de la diversidad en la población, pero es poco probable que tenga un gran efecto en todos los marcadores que se utilizan en combinación.

Chacón, (2007), caracterizó 566 aislamientos de *P. infestans* recogidos de diferentes hospederos de solanáceas en Ecuador con cuatro marcadores SSR (4B, 4G, 2D, y 1F) con el propósito de evaluar la diversidad genética del patógeno en el país. En el análisis de riqueza alélica encontró que los cuatro loci SSR revelaron cantidades diferentes de riqueza alélica, en comparación con todo el conjunto completo de los aislamientos. Setenta y siete alelos fueron identificados entre los cuatro loci SSR. El locus 4B mostró 33 alelos, el locus 1F 25 y el locus 2D 9 alelos. El análisis con los cuatro marcadores SSR identificó mayor diversidad de la que había sido detectada con marcadores de uso convencional. Adicionalmente algunas cepas mostraron más de dos bandas o alelos por locus, lo que puede indicar posibles poliploidías o aneuploidías. (Chacón, 2007)

En el trabajo de Oliva, (2009) se reporta igualmente de 3 a 6 alelos identificados para el locus Pi4B posiblemente debido a la duplicación de este lugar en el genoma, así mismo para el locus G11 y D13 mostrando mayor número de alelos por locus, con 24 y 21, respectivamente. Esto es consistente con los reportes anteriormente descritos. Además se reporta tres alelos para el locus Pi63 en algunas cepas, lo que sugiere la existencia de aneuploidía. Así mismo el análisis de la diversidad genética de 271 aislamientos de *P. infestans* con SSR en China, también mostró un patrón de

bandas que indica tres alelos (206, 214, 218) en el locus de Pi4B. Así como en los anteriores trabajos, en esta caracterización también plantearon que los datos de los dos aislados no podían ser utilizados para el análisis estadístico debido a que este se basó en el supuesto de que *P. infestans* es diploide (Zhi-Hui Yang, 2009).

La presencia de uno o tres alelos en un locus ha sido descrito previamente en *P. infestans* por van der Lee *et al.*, (2004). Este autor demostró la presencia de grupos de ligamiento con trisomía en el 10-16% de la progenie de dos cruces individuales de *P. infestans*, sugiriendo la trisomía en *P. infestans* como un evento frecuente en las poblaciones del patógeno. La trisomía podría explicar fácilmente la presencia de más de tres alelos obtenidos con los marcadores microsatélites empleados en esta caracterización, sin embargo y teniendo en cuenta que los aislamientos evaluados presentan reproducción asexual, y no se han encontrado reportes del tipo de apareamiento A2 en Nariño y Putumayo este mecanismo no se estaría presentando, pero puede ocurrir que la que la población estudiada está cambiando por un proceso de recombinación mitótica. Este proceso ha jugado un papel importante en la evolución de las poblaciones *P. infestans* a nivel mundial (McDonald y Linde, 2002) y probablemente también en la variabilidad genética de las poblaciones del patógeno en *S. betaceum*. Por lo tanto es probable que un origen híbrido de los aislamientos podría asociarse con la formación de individuos con los niveles de ploidía diferentes, como lo sugerido para *P. andina* (Oliva *et al.*, 2010).

Los resultados de esta caracterización mostraron un alto polimorfismo genético por parte de los 6 cebadores microsatélites utilizados, debido a la ocurrencia en las poblaciones estudiadas de dos o más alelos por locus, y donde las frecuencias de estos variaron entre 0.03 y 0.5 siendo menores a 0.95 por lo cual se pudo considerar que el 100% de los locus fueron

polimórficos en Nariño y Putumayo. Igualmente los resultados mostraron una elevada relación entre los aislamientos obtenidos de tomate de árbol en Nariño y Putumayo con el aislamiento obtenido del mismo hospedero en Ecuador (aislado 3210), donde se observó la coincidencia de varios alelos (Tabla 6), esto confirma la similitud en las poblaciones de *Phytophthora* de las zonas de Nariño y Valle de Sibudoy con Ecuador, situación que previamente había sido observada por diferentes autores (Jaramillo, 2003; Lagos, 2002; Erazo y Ordoñez, 2005).

Es importante destacar que siendo poblaciones clonales donde solo se encontró el tipo de apareamiento A1, los valores de diversidad genética de Shannon revelaron una alta diversidad genética en las poblaciones estudiadas (Tabla 8). Esta diversidad genética puede verse afectada de diferente manera por distintos procesos evolutivos y ecológicos o reproductivos de acuerdo a la actuación que éstos tengan al nivel de las poblaciones o de la especie. (Sosa *et al.*, 2002, González, 2008).

También se evidencio un promedio alto en la heterocigosidad observada en comparación con la esperada (Tabla 8), esperándose un valor de 0.563 y observando un valor de 1, en consecuencia se encuentra un alta variabilidad genética, Nei (1978) asegura que el promedio de heterocigosidad es el método de medición más adecuado de la variación genética, pues no depende la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias alélicas. (Sosa *et al.*,2002).

El índice de heterocigosidad según Nei (1978) proporciona una aproximación de la diversidad genética cuando es comparada en un tiempo uno y un tiempo dos, especialmente cuando ha sucedido un evento como un cuello de botella en la población, por lo que es utilizado para medir este parámetro en las poblaciones, por lo cual estos datos pueden ser útiles para posteriores estudios de seguimiento de estas mismas poblaciones después

de un tiempo, y así comparar posibles cambios es la estructura genética de estas.

Nei (1978) define la identidad genética entre dos poblaciones como la probabilidad de que dos alelos (uno de cada población) sean idénticos. Estos valores pueden variar entre cero (para poblaciones completamente distintas) hasta uno (si son genéticamente idénticas), en este estudio se encontró un índice de identidad genética alto (0.93) entre las dos poblaciones de estudio (Nariño y Putumayo), y por ende la distancia genética fue baja (0.066) (Tabla 10), siendo inversamente proporcionales, dicha identidad puede estar bajo la influencia de alelos que comparten las dos poblaciones.

Los marcadores microsatelites evaluados en esta investigación demostraron la alta variabilidad genética de *P. infestans sensu lato*, que no fue detectada con marcadores convencionales, tales como RFLP's, y ADN mitocondrial que fueron realizados en esta mismas poblaciones por parte del Grupo Genética y Evolución de organismos Tropicales (*Quinto informe MADR, 2010*).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) usado para probar la estructuración genética en las poblaciones de estudio mostró una alta variabilidad genotípica intrapoblacional (84%), mientras que el 16 % de la variabilidad de *P. infestans* de este estudio se atribuye a la variabilidad entre las poblaciones (Tabla 11), mostrando una divergencia genética baja entre poblaciones y un flujo genético alto entre estas lo que puede generar nuevos polimorfismos y nuevas combinaciones de genes. La proximidad geográfica que presentan los departamentos de Nariño y Putumayo favorecen el transporte de material vegetal entre estas zonas con fines de multiplicación y siembra pueden facilitar el intercambio de poblaciones de *P. infestans* y así conducir a la mezcla genética entre poblaciones de este patógeno. Tales intervenciones humanas facilitan el flujo genético y por ende la variabilidad se hará mayor dentro de las poblaciones y menor entre ellas.

La alta diversidad genética en las poblaciones de los patógenos puede ser generada por diferentes factores entre los principales está el flujo de genes, la recombinación sexual y asexual; y las mutaciones (Paez, 2005). Probablemente, la recombinación asexual y las mutaciones han sido los factores que más han contribuido a esta diversidad, ya que el flujo de genes, interpretado como un fenómeno migratorio de un país a otro, no fue considerado en este estudio.

Las poblaciones de *P. infestans* estudiadas, estando limitadas al tipo de apareamiento asexual (A1), mecanismos como, recombinación mitótica y mutaciones son las fuentes que generan diversidad y han sido propuestos para explicar cambios genéticos en poblaciones clonales de *P. infestans*. (Goodwin, 1997; Abu-El Samen *et al*, 2003). La recombinación mitótica no comprende la generación de nuevos alelos, en muchos casos lo que sucede es que aparecen cambios de loci heterocigotos a loci homocigotos; además, este fenómeno puede mostrar la variación recesiva que previamente estaba oculta en forma heterocigota, lo que significa la pérdida de una banda en el análisis de patrones de ADN e indica un polimorfismo (Goodwin, 1997). En otras especies de *Phytophthora* como *P. cinnamomi* la variación fenotípica identificada dentro de linajes clonales se explica por recombinación mitótica (Dobrowolski *et al.*, 2003). Otra explicación potencial de la variación nueva en linajes clonales de *P. infestans* es la recombinación parasexual, y aunque es una probabilidad, no es la explicación más frecuente para la mayoría de los cambios observados (Páez, 2005). En *P. ramorum* se sugiere que las poblaciones descubiertas atacando los viveros se pueden caracterizar por la rápida mutación, deriva genética y el flujo genético limitado (Goss *et al.*, 2009).

Bajo estricta reproducción asexual, la variación genética entre los aislados se distribuye entre los genotipos encontrados y estos deben diversificarse con el

tiempo en linajes clonales discretos caracterizados por una mezcla de genotipos estrechamente relacionados.

Ya descartada la presencia del tipo de apareamiento A2 de la población estudiada, las mutaciones causadas por deleciones, inserciones o translocaciones son otra fuente primaria de variación genética y, aunque no se tiene información precisa sobre la tasa de mutación en *P. infestans*, estas serían frecuentes en una epidemia de tizón tardío (Paez, 2005). Una sola lesión de *P. infestans* puede producir cientos de miles de esporangios en ciclos de 4-7 días (Erwin y Ribeiro, 1996); la tasa de multiplicación podría ser aún mayor si las condiciones son favorables para la producción de zoosporas, ya que un esporangio puede producir entre 6 y 12 zoosporas (Erwin y Ribeiro 1996). No obstante, no es necesaria una alta tasa de mutación para explicar algún cambio genético (Goodwin 1997).

El genoma completo de *P. infestans* presenta 17797 genes codificantes de proteínas y con una distribución inusual de estos que se debe a que *P. infestans* posee un alto porcentaje de contenido repetido (aprox. 74%), además está compuesto por una serie de efectores patogénicos con una evolución constante y un aumento de genes CRN y RXLR y moduladores con la capacidad de alterar la especificidad de la célula hospedadora. (Hass *et al.*, 2009). Según Kamoun, (2009) las secuencias repetidas del genoma de este patógeno son muy inestables y generan altas tasas de mutación, por eso los genes presentes en ellas tienen mayor probabilidad de cambiar que aquellos genes que están en zonas no repetidas.

En contraste, si el intercambio de información genética entre los individuos está pasando a través de la reproducción sexual, la variación genómica debe distribuirse uniformemente a través de los aislamientos. Conclusión similar podría inferirse de altos valores de heterocigosis esperada en todos los loci, ya que es posible que los valores altos de heterocigosidad están

relacionados con la naturaleza de los marcadores de microsatélites debido a que estas regiones muestran mayores tasas de mutación que otros marcadores genotípicos (Schlotterer, 2000; Estoup *et al.*, 2002; Nybom, 2004). En alta poliploidía tales mutaciones pueden acumularse más rápidamente con el tiempo y puede resultar en un aumento de la heterocigosidad (Loh *et al.*, 2009).

La variabilidad presentada por los patógenos del género *Phytophthora* hace que las estrategias comunes de control resulten ineficientes después de cierto periodo de aplicación. Así, las estrategias de control de la enfermedad por parte de los agricultores y campesinos deberán ser enfocadas hacia una población de patógenos y no hacia uno o pocos individuos, y entender la estructura de las poblaciones en cuestión ayuda a predecir cómo la población del patógeno se desenvolverá en respuesta a las prácticas de control (McDonald y Linde, 2002).

7.2 Estructura Poblacional y distribución geográfica.

El dendrograma obtenido con el método de agrupación de UPGMA que se representa en la figura 14, mostró un coeficiente cofenético elevado ($r= 0,96$), lo que indica un buen ajuste de los datos originales a la agrupación lograda, además se caracteriza por la presencia de ramas relativamente cortas indicando alta similitud genética (Belaj *et al.*, 2004). Este análisis de grupos realizado demuestra que los aislamientos de *P. infestans* estudiados no presentan muchas diferencias entre sí, ya que mostraron coeficientes de similitud generalmente altos (1,0), estos valores superan el 0,75 de similitud entre los grupos formados. Este agrupamiento está soportado por el análisis de estructura de poblaciones donde nos indicó que el menor número de grupos es el mejor para representar a la población, en este caso dos grupos, sin embargo se tuvo en cuenta el tercero ya que presentó una similitud

menor y únicamente dos aislamientos que pueden presentar características o alelos particulares.

Inicialmente existe la separación del aislamiento PPI014 considerado procedente de Perú y obtenido del hospedero *S.tuberosum* a una distancia menor a 0.38, del grupo de los demás aislamientos obtenidos de *S. betaceum*, observándose una diferenciación clara entre estos, ya que el aislamiento obtenido de papa pertenece al linaje clonal EC-1 y haplotipo mitocondrial IIa (Jaramillo, 2003) y los otros grupos contienen aislamientos de linaje clonal EC-3 y haplotipo mitocondrial I-a característico de *Phytophthora* aislada de tomate de árbol.

Los resultados confirman la aplicabilidad para la discriminación de linajes clonales obtenida a partir del análisis de SSRs, coincidiendo con los resultados de Oliva *et al.*, (2006) quienes a partir del análisis de componentes principales de 200 aislamientos de *P. infestans* obtenidos en los altos andes de Ecuador y 9 aislamientos usados en la caracterización por SSRs presentada por Lees *et al.*, (2006), pudieron diferenciar claramente los linajes EC-1, EC-2, EC-3 y US-1 siendo grupos previamente descritos en Ecuador (Ordoñez *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 2004) diferenciados de los aislamientos utilizados por Lees *et al.*, (2006).

El resultado de agrupamiento de los aislamientos obtenidos de tomate de árbol muestra que existe la separación de tres grupos. El Grupo I contiene los aislamientos obtenidos de tomate de árbol en su gran mayoría (12 de los 15 analizados) procedentes de 4 municipios (Santiago, Colon, Sibundoy y San Francisco) del departamento de Putumayo, 3 aislamientos pertenecientes a los municipios de Pasto y Consacá del Departamento de Nariño y el aislamiento control 3210 obtenido del mismo hospedero en Ecuador. Esto es evidencia de una alta similitud entre las poblaciones del patógeno en cultivos de Nariño y Putumayo; y posiblemente estas

poblaciones tengan algún parentesco con las poblaciones del Ecuador, pero en este estudio no podemos afirmarlo ya que solamente se tomó un aislamiento de Ecuador y este fue utilizado como control positivo, además en Ecuador la especie que ataca los cultivos de tomate de árbol se conoce como *P. andina* perteneciente al linaje clonal EC-3 reportada por *Ordoñez et al.*, (2000), aunque el origen de esta especie aun no es muy claro.

El segundo grupo encontrado contiene gran parte de los aislamientos (10 de 15 aislamientos) procedentes del municipio de Buesaco, Pasto, e Iles del Departamento de Nariño y 3 aislamientos provenientes de los municipios de Santiago, San Francisco y Colon en Putumayo. Finalmente en el Grupo III se ubican dos aislamientos que pertenecen al Municipio de la Unión del Departamento de Nariño.

Teniendo en cuenta esta forma de agruparse, es evidente que los aislados tienden a organizarse dentro de clados por zonas geográficas, sin embargo, existen aislamientos compartidos entre el Grupo I y II, y los valores de similitud entre los grupos son altos, concluyendo que no existen grandes diferencias basadas en términos de distancias geográficas, lo que puede corroborarse con el análisis de varianza molecular el cual revelo que existe mayor variación genética dentro de las poblaciones que entre estas.

Los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento y reflejados en el mapa mostraron alguna evidencia de subestructuración geográfica en Nariño y Putumayo, donde se observó una clara diferenciación en tres zonas, la del valle de Sibundoy en el putumayo en donde se encuentran la mayoría de los aislamientos que se ubicaron en el GRUPO II, la segunda en el departamento de Nariño en donde se distribuyen gran parte de los aislamientos del GRUPO I, y la tercera en donde se ubica un subgrupo de la población de Nariño conformado por los dos aislamientos del municipio La Unión que se organizaron de manera independiente en el GRUPO III.

En Ecuador se ha establecido que la subestructuración geográfica puede estar relacionada con varios factores como aislamiento geográfico, la adaptación a determinadas condiciones climáticas, y la especificidad de huésped (Chacón, 2007). En este estudio la distancia geográfica entre las regiones no es considerable, pero el principal factor que restringe el flujo de genes probablemente sea por la barrera de grandes alturas y por características biogeográficas de cada zona como la media de precipitaciones y la temperatura son diferentes en los dos departamentos de estudio. De igual manera los esporangios de *P. infestans* son susceptibles a la radiación solar y esto también puede restringir el transporte aéreo en las tierras altas (Mizubuti *et al.*, 2000). Por lo tanto, todas estas circunstancias pueden estar limitando en alguna medida el intercambio de información genética y haciendo que estas poblaciones se estructuren de esta manera.

El análisis intrapoblacional de redes a partir de los 15 haplotipos generados (Tabla 12), demostró una red relativamente compacta (Figura 17), lo que indica que estas poblaciones se están limitado a un pequeño número de haplotipos estrechamente relacionados en su mayoría, los haplotipos distantes ubicados al margen de la red, y relacionados solamente con un haplotipo, puede ser bien el resultado de eventos de mutación raras o eran inmigrantes de lugares con genotipos intermedios (Goss *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

Los marcadores microsatélites utilizados en este trabajo presentaron un elevado porcentaje de polimorfismo, encontrando un número total de 24 alelos diferentes definidos para los 6 marcadores evaluados.

El locus más polimórfico y el que presentó mayor número de alelos fue el Locus 4B, revelando así que las poblaciones asexuales de *P. infestans* presentan un cierto grado de poliploidia.

Las frecuencias alélicas de menor valor detectadas en este estudio corresponden con alelos únicos, presentes exclusivamente en uno o dos aislamientos de la población. Estos alelos son de gran interés ya que pueden servir de marcadores específicos de aislamientos determinados.

El análisis de diversidad genética de *P. infestans* mediante SSRs, mostró un porcentaje alto de variabilidad genética dentro de las poblaciones de Nariño y Putumayo y muy bajo que entre ellas, variabilidad que posiblemente puede ser ocasionada por recombinación mitótica y mutaciones, ya que se descarta la posibilidad de cambios por recombinación sexual.

El análisis de agrupamiento demostró una clara diferenciación de tres grupos observándose relación con la zona biogeográfica de donde fue aislado el patógeno, así mismo permitió realizar una diferenciación clara de linajes clonales de estos aislamientos comparándolos con el control obtenido de *S. tuberosum*.

RECOMENDACIONES

El estudio de la diversidad genética de *P. infestans* sensu lato es de suma importancia para la determinación del comportamiento del mismo, su monitoreo, seguimiento y a la vez para el futuro desarrollo de estrategias apropiadas de manejo de la enfermedad y control del patógeno. En este sentido es recomendable evaluar los niveles de resistencia a productos comerciales de los clusters encontrados en el patógeno y de los niveles de virulencia de las poblaciones. Adicionalmente es recomendable evaluar los niveles de resistencia de las cultivares usados por los agricultores en los departamentos de Nariño y Putumayo

Realizar más estudios a nivel intrapoblacional a través del tiempo, y llevando un registro permanente de factores externos a la población (condiciones climatológicas, eventos por acción del hombre) para así poder monitorear la evolución de las poblaciones en determinadas zonas geográficas de gran impacto de la enfermedad y determinar las causas de su variabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

Adler, N., Chacon, G., Forbes, G. y Flier, W. (2002). *Phytophthora infestans* sensu lato in South America population substructuring through host-specificity. Lizarraga, Late blight: Managing the global threat, proceedings. Lima (Peru). CIP. Global Initiative on Late Blight. pp. 13-17.

Adler, N., Erselius, L., Chacón, M., Flier, W., Ordóñez, M., Kroon, L., y Forbes, G. (2004). Genetic diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology*, 94, 154-162.

AGRIOS, G. (2005), *Fitopatología*. Mexico, Editorial Limusa.

Alpizar, L., Carbone, I., y Ristaino, J. (2006). An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. Department of Plant Pathology and Center for Integrated Fungal Research, North Carolina State University, Raleigh. *PNAS*, 104(9), 3306-3311.

Andrивon, D. (1996). The origin of *Phytophthora infestans* populations present in Europe in the 1840s: a critical review of historical and scientific evidence. *Plant Pathol*, 45, 1027-1035.

Andrison, D. (1995). Biology and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans*. *In soil. Mini Rev*, 85, 1053-1995.

Belaj, A., Satovic, Z., Trujillo, I., y Rallo, L. (2004). Genetic Relationships of Spanish Olive Cultivars Using RAPD Markers. *HortSci*. 39(5), 948-951.

Bernal, J. y Diaz, C. (2003). Tecnología para el cultivo del tomate de árbol. Manual Técnico 3. Ecorregión Andina Centro de Investigación La Selva. Rionegro, Antioquia.

Blair, J., Coffey, M., Park, S., Geiser, D., y Kang, S. (2008). A multilocus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequence. *Fungal Genetics and Biology*, 45, 266–77.

Calderon, H., y Castro, M. (2002). Estructura poblacional del fitopatógenos *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Instituto de Biología, Medellín, Colombia.

Cárdenas, M., Grajales, A., Sierra, R., Rojas, A., González, A., Vargas, A., Marín, M., ... Restrepo, S. (2011). Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region. *BMC Genetics*. doi:10.1186/1471-2156-12-23.

Carreño, N., Vargas, A., Bernal, A. y Restrepo, S. (2007). Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 320-329.

Carter, D., Archer, S., Buck, K., Shaw, D., y Shattock, R. (1990). Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycol. Res.* 94, 1123-1128.

Chacón, M. (2007). Variability of *Phytophthora infestans sensu lato* in the highland tropics of Ecuador. (Tesis de Doctorado). Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, Switzerland.

Chavarro, E., y Ángel, J. (2005). Reacción en cadena de la polimerasa 16S DNAr y Amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN para la detección y diferenciación molecular de *Ralstonia solanacearum* en plantas de *Musa sp.* Memorias II Seminario Internacional sobre Producción, Comercialización e Industrialización de Plátano. Manizales, Colombia.

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

De Rojas, E., y Estrada, N. (1953). Efecto de la N-triclorometil-tiotetrahidroftalamida, en el control del *Phytophthora infestans* de la papa. *Agricultura Tropical*, 10(3), 43-44.

Derie, M. y Inglis, D. (2006). Persistence of complex virulences in populations of *Phytophthora infestans* from mitochondrial and nuclear gene genealogies. Department of Plant Pathology and Center for Integrated Fungal Research, North Carolina State University, Raleigh.

Eraso, D., y Ordoñez, J. (2005). Caracterización genotípica de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary aisladas de tomate de árbol (*Solanum tuberosum*) y tomate de mesa (*Lycopersicon sculentum*) en

los departamentos de Nariño y Putumayo. (Tesis de pregrado). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Pasto, Colombia.

Erwin, D., y Ribeiro, O. (1996). *Phytophthora* Diseases worldwide. APS. Minesota: *Press the American Phythopatological society*. St Paul, 562.

ESPINAL, C., MARTINEZ, H., y PEÑA, Y. (2005). La Cadena de los Frutales de Exportación en Colombia una Mirada Global de su Estructura y Dinámica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia.

Espitia, R. (2001). Sensibilidad in vitro de 32 aislamientos de *Phytophthora infestans* Mont de Bary de papa en Cundinamarca, Nariño y Boyacá al fungicida Metalaxyl. (tesis de pregrado) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía, Bogotá, Colombia.

Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.-M., (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, 11, 1591-1604.

Forbes, G., Escobar, C., Ayala, C., Revelo, J., Ordoñez, M., Fry, B., Doucett K., y Fry, W. (1997). Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology*, 87(4), 375-380.

Forbes, G., Goodwin, S., Drenth, A., Oyarzum, P., Ordonez, M., y Fry, W. (1998). A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, 82, 811-818.

Forbes, G., Escobar, X., Ayala, C., Revelo, J., Ordoñez, M., Fry, B., Doucett, K., Fry, W. (1997). Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology*, 87, 811-818.

Fry, W., y Goodwin, S. (1997). Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis*, 81, 1349-1357.

Fry, B., Doucett, K., y Fry, W. (1997). Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology*, 87(4), 375.

Fry, E., Drenth, A., Spielman, J., Mantel, B., Davidse, L., y Goodwin, S. (1991). Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Phytopathology*, 81(10), 1330-1336.

Fry, W., y Goodwin, S. (1997). Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience* 47, 363-370.

Fry, W., Goodwin, S., Dyer, A., Matuzsak, J., Drenth, A., Tooley, P., Sujkowsky, L.,... y Sandlan, K. (1993). Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways and implications. *Plant Diseases*, 77 (7), 653 – 661.

Garnica, D., Pinzon, A., Quesada, L., Bernal, A., Barreto, E., Grunwald, N., y Restrepo, S. (2006). Open Access Survey and analysis of microsatellites from transcript sequences in *Phytophthora* species: frequency, distribution, and potential as markers for the genus. Laboratorio de Micología y Fitopatología Universidad de Los Andes. Bogotá, Colombia.

Garrett, K., Nelson, R., Mundt, C., Chacón, G., Jaramillo, R. y Forbes, G. (2001). The effects of host diversity and other management components on

epidemics of potato late blight in the humid highland tropics. *Phytopathology*, 91, 993-1000.

GELT, (Gobierno En Línea del orden Territorial). (2008). Programa Gobierno en Línea del Ministerio de Tecnologías de la Información y las Comunicaciones, Federación Colombiana de Municipios. Disponible en <http://www.skyscrapercity.com>

GENPAT Grupo de investigación Genética de Patosistemas. (2010). Quinto informe de actividades del macroproyecto Caracterización genética y fenotípica de las poblaciones de *Phytophthora infestans* procedentes de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) en las zonas productoras del sur de Colombia. Convocatoria Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2008, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural -Universidad de Nariño. Pasto, diciembre 2010. CONVENIO N° 057/07IICA-MADR.

Gilchrist, E. (2001). Evaluación de la diversidad genética y patogénica de las poblaciones del hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en Antioquia. (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

GISI, U. y COHEN, Y. (1996). Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Phytopathology*. (Vol. 34); p. 549-572.

Gomez, M., Amaya, M., Jaramillo, S., Lagos, L. y Marin, M. (2009). Variabilidad genética de aislamientos Colombianos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en solanáceas cultivadas en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 62(1).

Gomez, L., HU, Ch., Oliva, R., Forbes, G., y Ristaino, J. (2008). Phylogenetic relationships of a new species, *Phytophthora andina*, from the highlands of Ecuador that is closely related to the Irish Potato Famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Mycologia* 100(4), 590-602.

Gonzalez, E. (2008). Análisis de la diversidad genética en poblaciones naturales de especies vegetales amenazadas: *Ilex perado* ssp. *Lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Resultados Preliminares; 7-12.

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

Goodwin, S., y Drenth, A. (1997). Origin of the A2 Mating Type of *Phytophthora infestans* Outside Mexico. *Phytopathology*, 10(87), 992-999.

Goodwin, S. (1997). The population's genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 87, 462-463.

Goodwin, S., Ludwik, S., Sujkowski, C. y Fry, W. (1995). Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus, *Phytopathology*, 85, 669-676.

Goodwin, S., Smart, C., Sandrock, R., Dealh, K., Punja, Z., Fry, W. (1998). Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the Unites States and Canada during 1994 to 1996: Role of migration and recombination. *Phytopathology*, 88, 939-949.

Goodwin, S., Cohen, B., y Fry, W. (1994). Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 91, 11591-11595.

Goss, E., Larsen, M., Chastagner, G., Givens, D., y Grünwald, N. (2009). Population genetic analysis infers migration pathways of *Phytophthora ramorum* in US Nurseries. *PLoS Pathog*, 5(9), doi:1000583.

Griffith, G., y Shaw, D. (1998). Polymorphisms in *Phytophthora infestans*. four mitochondrial haplotypes are detected after pcr amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Enviromental microbiology*, 64(10), 4007- 4014.

Hidalgo, V. (2006). Caracterización molecular de la progenie de *Phytophthora Infestans*. (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.

Huarte, M., y Capezio, S. (2001). Niveles disponibles de resistencia al tizón tardío. some experiences under long days in Argentina. Crissman Western Washington. *Phytopathology*, 91, 606-612.

Jaramillo, S. (2003). Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Jarrin, C. (2006). Herramientas moleculares aplicadas a la investigación de *Phytophthora infestans* en la estación CIP Quito. Departamento de Patología. Centro Internacional de la Papa – Estación Quito.

Kamoun, S., Hraber, P., Sobral, B., Nuss, D., y Govers, F. (1999). Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 28, 94-106.

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

Knapova, G., GISI U, Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology*, 51, 641–53. 2002

Knapova, G., Schlenzing, A., y Gisi, U. (2001). Crosses between isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato and characterization of F1 and F2 progeny for phenotypic and molecular markers. *Plant Pathology*, 51, 698–709.

Kroon, L., Bakker, F., Van-Den, B., Bonants, G., Flier, W. (2004). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 766-782.

Lagos, L. (2002). Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (*mont.*) de Bary en las zonas productoras de para (*Solanum tuberosum*) en el departamento de Nariño. (Tesis de maestría) Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Santiago de Cali, Colombia.

Lees, A., Wattier, R., Shaw, D., Sullivan, L., Williams, N., y Cooke, D. (2005). Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology*, 55, 311–319.

Leon, H. (2004). Evaluación de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary colectados en Antioquia mediante tipo de apareamiento y haplotipos mitocondriales. (Tesis de pregrado) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín, Colombia.

Lo, E., Stefanović, S., y Dickinson, T. (2009). Population genetic structure of diploid sexual and polyploid apomictic hawthorns (*Crataegus*; Rosaceae) in the Pacific Northwest. *Molecular Ecology Notes*, 18, 1145-1160. 2009.

Lobo M. (2004). Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt), frutal promisorio para la diversificación del agro andino. Programa de Recursos Genéticos y Biotecnología Vegetales CORPOICA C.I. La Selva Rionegro Ant.

Marin, M., y Mira, J. (1998). 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. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Mazo, J., y Patiño, L. (1995). Determinación de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. (Tesis de pregrado) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín, Colombia.

McDonald, B., y Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Rev. Phytopatholog*, 40, 349-379.

MESA, V., MIDEROS, M., JARAMILLO, S., CORTES, J., LAGOS, L., PINEDA, Z. y MARIN. M. (2008). Variabilidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes del suroccidente de Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(3), 167-172.

MIDEROS, M. Caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary obtenidas de diferentes especies de solanáceas cultivadas en las zonas productoras de Nariño y Putumayo. (2008). Trabajo de grado para optar el título de Biólogo. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Nariño. Programa de Biología San Juan de Pasto.

Mideros, M., Cárdenas, M., Tabima, J., Castillo, Y., Obando, C., Lagos, L., Bernal, A., ... y Restrepo, S. A diverse and specific *Phytophthora infestans* sensu lato population associated with *Solanum betaceum* in Southern Colombia. (Tesis de Maestría). Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia. (En publicación)

Mizubuti, E., Aylor, D., y Fry, W., (2000). Survival of *Phytophthora infestans* sporangia exposed to solar radiation. *Phytopathology*, 90, 78-84.

Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.

Nybom, H., (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143–1155.

OCHA Colombia. Oficina para la coordinación de Asuntos Humanitarios. Naciones Unidas Colombia. Centro de mapas. Disponible en la página <http://www.colombiassh.org/site/>. Visitado 23 Mayo 2010.

Ochoa, D. (2004). Determinación de la sensibilidad en aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* hacia Cymoxanil, Dimetomorf y Clorotalonil. (Tesis de pregrado) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

Oliva, R. (2009). Occurrence of sympatric *Phytophthora* species in the highland of Ecuador. (Tesis Doctoral). SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH. Alemania.

Oliva, R., Flier, W., Gessler, C., y Forbes, G. (año). Producción, Viabilidad y capacidad de infección de las oosporas de *Phytophthora infestans* en Ecuador. *Centro Internacional de la Papa (CIP, Quito), Plant Research International (PRI, Wageningen), Swiss Federal Institute of Technology (ETH, Zurich)*.

Oliva, R., Chacon, M., Cooke, D., Lees, A., y Forbes, G. (2007). Is *Phytophthora infestans* a good taxonomist? Host recognition and co-evolution in the *Phytophthora/Solanum* interaction. *Acta Horticulturae*, 745, 465–71.

Oliva, R., Erselius, L., Adler, N., y Forbes, G. (2002). Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador. *Plant Pathology* 51, 710–9.

Oliva, R., Erselius, L., Adler, N., y Forbes, G. (2002). Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador. *Plant Pathology*; 51: 710-719.

Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., Boutemy, L., Bozkurt, T.O., Chaparro, A., Segretin, M.E., ... y Kamoun, S.. (2010a). Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cellular Microbiology*, 12, 705-715.

Oliva, R., Kroon, L., Chacon, G., Flier, W., Ristaino, J., y Forbes, G. (2010b). *Phytophthora andina* sp nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the Andean highlands. *Plant Pathology* 59, 613-625.

OPCION PUTUMAYO. Valle de Sibundoy. Disponible en Internet, URL:<http://personales.com/colombia/cali/ONGFOP/valle.htm>. 2007

Ordoñez, M., Hohl, H., Velasco, J., Ramon, M., Oyarzun, P., Smart, C., Fry, W., ... Erselius, L. (2000). A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans* attacks wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology*, 90, 197 – 202.

Oyarzun, P., Pozo, A., Ordoñez, M., Doucet, K., y Forbes, G. (1998). Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology*, 88(3),265.

Paez, O., Valverde, R., Gomez, L., y Brenes, A. (2004). Determinación del tipo de apareamiento con marcadores moleculares en aislamientos de *Phytophthora infestans* colectados en plantaciones de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 28(2), 9 -16.

PAEZ, O., VALVERDE, R., GOMEZ, L. y BRENES, A. (2005). Diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en plantaciones de papa en Costa Rica con el uso de RAPD. *Agronomía Costarricense*. 1 (29), 45-55.

Peakall, R., y Smouse, P. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update, *Evolution, Ecology and Genetics*, Research School of Biology, The Australian National University, Canberra ACT 0200, Australia and Department of Ecology, Evolution and Natural Resources, School of Environmental and Biological Sciences, Rutgers University, New Brunswick.

Pérez, W., Gamboa, J., Falcon, Y., Coca, M., Raymundo, R., Nelson, R. (2001). Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*, *Phytopathology*, 91, 56-965.

Platt, H., Peters, R., Medina, M. y Arsenault, W. (1999). Impact of seed potatoes with *Phytophthora infestans* (US-1 or US-8 genotypes) on crop growth and disease risk. *American Journal of Potato Research*. 75, 767-73.

Rave, M., y Roldán, P.(1998). Evaluación de la resistencia in vitro e in vivo de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary al fungicida Metalaxyl, en aislamientos del departamento de Antioquia. (Tesis de pregrado) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín, Colombia

Revelo, E., Dorado, G., Lagos, L. y Burbano, O. (2011). Foliar virulence of isolates of *Phytophthora infestans* sensu lato on detached leaves of two *Solanum betaceum* cultivars. *Tropical plant pathology*, vol.36, n.6, pp. 367-373.

Sacristan, S., y Garcia, F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology*, 9(3), 369-384.

SAMAUCHA, Y. y GISI, U. (1987). Use of two- and three-way mixtures to prevent development of resistance to phenylamide fungicides in *Phytophthora* and *Plasmopora*. *Phytopathology*. (Vol. 77), p.1405-1409.

Schlotterer, C. (2004). The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nat Rev Genet*, 5(1), 63-69.

Shaw, D. (1991). Genetics. *Advances in Plant Pathology*. 7: 131-168.

Sosa, P., Batista, F., González, M., y Bouza, N. (2002). La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: *Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación*. Bañares, A. (Ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España. 133-160.

Van-Der, L., Testa, T., Robold, A., Van't, A., Klooster, J., y Govers, F. (2004). High-density genetic linkage maps of *Phytophthora infestans* reveal trisomic progeny and chromosomal rearrangements. *Genetics* 167, 1643-61.

Restrepo, S., Vargas, A., Gonzales, A., Garnica, D., Sierra, R., Rodriguez, L., Pinzon, A., ... Bernal, A. (2008). *Phytophthora infestans*: genética, genómica y bioinformática, la unión hace la fuerza.

Zapata, J. L. (2002). Aspectos sobre el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en Colombia. Perfil del país. *Fernández-Northcote*, Memorias del taller internacional Complementando la resistencia al tizón (*Phytophthora infestans*) en los Andes, 13–15.

Yang, Z-H., Zhua, J-H., Shen, J-W., Yao, G-S., y Liu, R. (2009).
Microsatellite Genotypic Analysis of *Phytophthora infestans* in China.
Department of Plant Pathology, Agricultural University of Hebei Control
Centre of Plant Pathogens and Plant Pests of Hebei Province Baoding,
Hebei Province.

ANEXOS

ANEXO A. Formato de registro de los cultivos de *Solanum betaceum* utilizados en el estudio



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL - UNIVERSIDAD DE NARIÑO -
GRUPO DE INVESTIGACIÓN GENÉTICA DE PATOSISTEMAS



FORMATO DE REGISTRO CULTIVOS DE *Solanum betaceum*

Cod.	Fecha	Propietario de cultivo		Localización			Coor. GPS		Aplicación de fungicidas		Material infectado	
							N	O	Cuales:	si	no	
				Dpto./mun:								
				Cor. Ver.							Phytophthora	
							Alt		Ultima Fum:			
	Variedad cultivo		Parte de la planta			Observaciones					Responsable	
			Hoja	Tallo	Fruto							

Cod.	Fecha	Propietario de cultivo		Localización			Coor. GPS		Aplicación de fungicidas		Material infectado	
							N	O	Cuales:	si	no	
				Dpto./mun:								
				Cor. Ver.							Phytophthora	
							Alt		Ultima Fum:			
	Variedad cultivo		Parte de la planta			Observaciones					Responsable	

ANEXO B. Registro de Aislamientos incluidos en esta caracterización.

Aislamiento	Fecha	Propietario	Depto.	Municipio	Corregimiento	GrN	MinN	SegN	GrO	MinO	SegO	Altura	Precisión	Variedad
Aislamientos Putumayo														
P8001	8-Sep-08	Evert Noguera	Putumayo	SANTIAGO	MUCHIVIOY	1	7	381	77	0	616	2296	11	HIBRIDO
P8005	8-Sep-08	Fredy Bravo	Putumayo	SANTIAGO	CASCAJO	1	7	846	77	1	160	2247	9	ND
P8008	13-Sep-08	Jhon Buesaquillo	Putumayo	SANTIAGO	BALSAYACO	1	6	949	76	58	619	2078	9	COMUN
P8012	14-Sep-08	Salvadora Chasoy	Putumayo	COLON	LOS TERMALES	11	11	6	76	58	22.8	2094	9	INJERTO
P8031	27-Sep-08	Pablo Jacanamejoy	Putumayo	SANTIAGO	QUINCHUAPAMBA	1	8	4.4	76	59	20.8	2088	11	COMUN
P8066	5-Oct-08	Florentino Quinchoa	Putumayo	SANTIAGO	VICHOY	1	10	157	76	59	528	2101	No registra	COMUN
P8070	11-Oct-08	Jose Jasoy	Putumayo	COLON	LAS PALMAS	1	11	765	76	57	456	nn	No registra	COMUN
P8075	11-Oct-08	Francisco Zamora Cordoba	Putumayo	COLON	SAN PEDRO	1	13	100	76	56	455	2168	8	INJERTO
P8087	7-Nov-08	Manuel Carlosama	Putumayo	SAN FRANCISCO	CASCO URBANO	1	10	629	76	52	694	2148	13	ND
P8093	7-Nov-08	Yuly Mora	Putumayo	SAN FRANCISCO	CHINAYACO	1	9	426	76	54	223	2150	8	COMUN
P8098	7-Nov-08	Marcial Lopez	Putumayo	SAN FRANCISCO	CHINAYACO	1	9	450	76	54	100	2142	9	HOLANDES
P9128	23 ene 09	Rosa Chunque	Putumayo	SIBUNDOY	EL EJIDO	1	11	22.5	76	56	7.4	2081	7	COMUN
P9158	5-Feb-09	Parmenide Matabanchoy	Putumayo	SIBUNDOY	SAN FELIX	1	10	34.1	76	55	0.35	2104	19	COMUN
P9159	6-Feb-09	Franco Canchala	Putumayo	SIBUNDOY	VILLA FLOR	1	12	38.3	76	55	5	2199	No registra	COMUN
P9164	6-Feb-09	Evelia Muñoz	Putumayo	SIBUNDOY	SAN FELIX	1	12	41.3	76	55	10.6	2201	13	COMUN
Aislamientos Nariño														
N9001	22 ene 09	Jose Silvio Santacruz	NARIÑO	BUESACO	MEDINA OREJUELA	1	18	801	77	8	470	2188	No registra	ND
N9003	22 ene 09	Jose Silvio Santacruz	NARIÑO	BUESACO	MEDINA OREJUELA	1	18	801	77	8	470	2188	No registra	INJERTO
N9004	22 ene 09	Jose Silvio Santacruz	NARIÑO	BUESACO	MEDINA OREJUELA	1	18	801	77	8	470	2188	No registra	INJERTO
N9005	22 ene 09	María Sara Paz	NARIÑO	BUESACO	MEDINA OREJUELA	1	18	801	77	8	470	2188	No registra	ND
N9010	22 ene 09	Luis Alberto Loaiza	NARIÑO	BUESACO	MEDINA OREJUELA	1	18	874	77	8	521	2173	No registra	ND

N9015	22 ene 09	Gerardo Díaz	NARIÑO	BUESACO	MEDINA OREJUELA	1	19	239	77	8	574	2131	No registra	INJERTO
N9030	22 ene 09	Sin registro	NARIÑO	BUESACO	LLANO LARGO	1	20	02,6	77	10	53,8	2343	5	COMUN
N9036	2-Feb-09	María Concepción Rodríguez	NARIÑO	BUESACO	ROSAL DEL MONTE	1	17	38,7	77	10	42,3	2543	No registra	ND
N9046	20-Feb-09	Fanny Jojoa	NARIÑO	PASTO	MOCONDINO	1	11	9	77	14	8,9	2796	12	COMUN
N9056	25-Mar-09	Bosco Gil Armero	NARIÑO	CONSACA	EL TEJAR	1	12	52,74	77	27	33,7	1861	No registra	COMUN
N9057	25-Mar-09	Bosco Gil Armero	NARIÑO	CONSACA	EL TEJAR	1	12	52,8	77	27	33,6	1892	No registra	COMUN
N9065	26-Mar-09	Antonio Iles	NARIÑO	ILES	VILLA NUEVA	0	58	41,1	77	32	4	2938	5	MANZANO
N9071	30-Jun-09	Manuel Araujo	NARIÑO	LA UNIÓN	Chical Alto	1	35	8.4	77	6	7,2	1951	8	INJERTO
N9072	30-Jun-09	Segundo Muñoz	NARIÑO	LA UNIÓN	Nn	1	35	31,9	77	5	21	2095	5	HOLANDES
N9073	30-Jun-09	-	NARIÑO	PASTO	OBONUCO	1	11	9	77	14	8,9	2543	10	ND

