

Determinación del tipo de apareamiento y evaluación del efecto de los ingredientes activos Metalaxil y Cimoxanil en poblaciones de *Phytophthora infestans* sensu lato aisladas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav).

DIANA MARCELA BURBANO DAVID

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Biología

2014

Determinación del tipo de apareamiento y evaluación del efecto de los ingredientes activos Metalaxil y Cimoxanil en poblaciones de *Phytophthora infestans* sensu lato aisladas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav).

DIANA MARCELA BURBANO DAVID

Directora:

LUZ ESTELA LAGOS MORA

MSc. Ciencias Biológicas

Asesora:

MARÍA FERNANDA MIDEROS BASTIDAS

MSc. Ciencias Biológicas

Universidad de Nariño

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Programa de Biología

2014

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

Artículo 1^{ro} del acuerdo No 324 de Octubre 11 de 1966 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

NOTA DE ACEPTACIÓN

MSc. Luz Estela Lagos Mora
Directora Trabajo de Grado

MSc. María Fernanda Mideros Bastidas
Asesora

Ph.D. Carol Rosero Galindo
Jurado

MSc. Carlos Arturo Betancourt García
Jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2014

ESTA INVESTIGACIÓN SE ENMARCO DENTRO DEL PROYECTO FINANCIADO POR EL MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL: 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 (CONTRATO No 2008L7231-3648).

TRABAJO DE GRADO FINANCIADO POR LA VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES, POSTGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO, EN LA CONVOCATORIA “ALBERTO QUIJANO GUERRERO”.

PASANTÍA REALIZADA EN CONVENIO ENTRE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO Y UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.

...Dedicado a mi familia,

los adoro con toda mi vida...

AGRADECIMIENTOS.

Esta investigación se realizó gracias al apoyo económico y técnico del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño y el laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes a cargo de la Doctora Silvia Restrepo.

Así mismo deseo expresar mis sinceros agradecimientos a mi directora de trabajo de grado MSc. Luz Estela Lagos Mora y a mi asesora MSc. María Fernanda Mideros, por su colaboración en la realización de este estudio, por su permanente disposición y por la confianza depositada en mí.

A mis jurados, Dra. Carol Rosero Galindo y Dr. Carlos Betancourth por brindarme la oportunidad de recurrir a su experiencia científica y sus valiosos aportes a esta investigación.

A mis padres por acompañarme y guiarme a lo largo del camino, por entender mis ausencias y mis malos momentos... A mis hermanos por su comprensión y apoyo

incondicional... A David, Santiago y Valeria por ser mi fortaleza y sobre todo mi gran felicidad.

A todas las integrantes del grupo de investigación Genpat, Sandrita, Caro, Derly, Anita, Mafe, Yenicita, Pauline, Carito, Eliza, Yayo, Vero, Eliana, Gabriela, Marce y Mayra, por toda su colaboración y enseñanzas, los buenos momentos y sobre todo por su paciencia.

Finalmente, son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las cuales me gustaría agradecer por su amistad, los buenos consejos, los regaños, el apoyo incondicional, el ánimo y la compañía en los momentos complicados y en los buenos momentos... A mis buenos amigos Eli, Derly, Nata, Liz, Sandrita, Mafe, Yulicita, Caro, Fiorela, Vivi, Cathe, Robert, Francis, Chris, Profe John Jairo, mil gracias por acompañarme en esta parte del camino.

RESUMEN.

Phytophthora infestans es considerado el agente causal de una de las enfermedades más limitantes de diferentes cultivos de Solanáceas en las regiones húmedas de las zonas templadas y tropicales. La enfermedad conocida como “tizón tardío” o “gota” afecta principalmente cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) y tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*) a nivel mundial; sin embargo, el patógeno ha sido detectado en otras especies de Solanáceas incluyendo tomate de árbol (*Solanum betaceum*), lulo (*Solanum quitoense*) y algunas especies silvestres donde la enfermedad es devastadora y difícil de controlar. Pese a que no se conocen los mecanismos involucrados en la infección en estos nuevos hospederos, estudios previos han mostrado una alta variabilidad en campo asociada a la presencia de nuevas poblaciones del patógeno con características fenotípicas y genotípicas diferentes a las reportadas para *P. infestans* en papa o tomate de mesa. Esta variabilidad en enfermedades emergentes se encuentra relacionada con posibles eventos de reproducción sexual, donde la recombinación puede dar lugar a aislamientos más agresivos y/o resistentes a fungicidas. Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se plantearon dos objetivos, el primero fue identificar los tipos de apareamiento presentes en las poblaciones de *P. infestans* sensu lato aislados de tomate de árbol mediante la determinación *in vitro* por medio de cruces de los aislamientos con las

cepas de referencia A1 (Z32) y A2 (US940480), autoapareamiento, cruces entre los aislamientos a evaluar y un cruce entre las cepas control, esta información fue corroborada con el uso de marcadores moleculares tipo CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences). El segundo objetivo fue evaluar el grado de sensibilidad de los aislamientos a los ingredientes activos metalaxil y cimoxanil mediante las técnicas *in leaf* y placa, las dosis utilizadas se calcularon siguiendo una escala comercial y fueron clasificados según su sensibilidad de acuerdo a la escala propuesta por Wang y colaboradores en 2002. Los resultados permitieron identificar un solo tipo de apareamiento (A1) y establecer que toda la población presenta un alto grado de sensibilidad al i.a. metalaxil, y en el caso del i.a. cimoxanil se encontró que con la metodología de discos de hoja el 8% de los aislamientos fueron resistentes con valores de EC-50 entre 12.7 y 150.8 µg/ml, el 14% intermedios con EC-50 que variaron entre 0.65 y 9.5 µg/ml y finalmente el 78% de la población fue sensible con un valor promedio de EC-50 de 0.011 µg/ml, estos resultados permitieron el establecimiento de la línea base de comportamiento de las poblaciones del patógeno frente a estas moléculas.

Palabras clave: *Phytophthora infestans*, tipo de apareamiento, sensibilidad, metalaxil, cimoxanil.

ABSTRACT

Phytophthora infestans is considered the causative agent of one of the most limiting diseases of different cultivated plants in the humid regions of the temperate and tropical zones. The disease known as "late blight" or "drop" primarily affects potato crops (*Solanum tuberosum*) and tomato on table (*Solanum lycopersicum*) worldwide; however, the disease has been detected in other Solanaceae species including tree tomato (*Solanum betaceum*), lulo (*Solanum quitoense*) and some wild species where the disease is devastating and difficult to control. Although the mechanisms involved in the infection in these new hosts, previous studies have shown a high variability in field associated with the presence of new pathogen populations with different phenotypic and genotypic characteristics to those reported for *P. infestans* in potato and table tomatoes. This variability in emerging diseases is related to sexual reproduction possible events, where recombination may lead to more aggressive and/or fungicide resistant isolates. Considering the above, in this work, two objectives were considered, the first was to identify mating types present in populations of *P. infestans* sensu lato isolated tree tomato by in vitro determination by crosses of isolates with the

reference strains A1 (Z32) and A2 (US940480) , self-pairing , crosses between isolates and to evaluate a cross between control strains , this information was corroborated by the use of molecular markers type CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) . The second objective was to evaluate the sensitivity of the isolates to metalaxyl and Cymoxanil active ingredients through the techniques in leaf and plate , the doses used were calculated following a commercial scale and were classified according to their sensitivity according to the scale proposed by Wang et al in 2002. results allowed to identify a single mating type (A1) and set the whole population has a high degree of sensitivity to ia metalaxyl , and in the case of the a.i. Cymoxanil found that the methodology of leaf discs 8% of the isolates were resistant to EC- 50 values between 12.7 and 150.8 mg / ml , 14% intermediate with CD -50 ranging between 0.65 and 9.5 mg / ml and finally 78% of the population was sensitive with an average value of EC- 50 of 0.011 mg / ml , these results allowed the establishment of the basis of behavior online pathogen populations against these molecules.

Keywords: *Phytophthora infestans* , mating type , sensitivity, metalaxyl, Cymoxanil .

TABLA DE CONTENIDO.

1. INTRODUCCIÓN.....	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	25
3.1. Objetivo General.....	25
3.2. Objetivos Específicos.....	25
4. ESTADO DEL ARTE.....	27
4.1. Importancia de las Solanáceas.....	27
4.2. Clasificación Taxonómica, Características Morfológicas, Biología y Distribución de <i>Phytophthora infestans</i>	29
4.2.1. Clasificación Taxonómica de <i>Phytophthora infestans</i>	29
4.2.2. Características Morfológicas de <i>Phytophthora infestans</i>	31
4.2.3. Biología de <i>Phytophthora infestans</i>	33
4.2.4. Distribución de <i>Phytophthora infestans</i>	36
4.3. Tipo de apareamiento en <i>Phytophthora infestans</i>	38
4.4. Sensibilidad de <i>Phytophthora infestans</i> a Fungicidas.....	40
4.4.1. Fungicidas sistémicos utilizados para el control químico de <i>Phytophthora infestans</i>	42

4.4.1.1.	Metalaxil.....	43
4.4.1.2.	Cimoxanil.....	44
5.	ANTECEDENTES.....	46
6.	METODOLOGÍA.....	54
6.1.	Área de estudio.....	54
6.1.1.	Departamento de Putumayo.....	54
6.1.2.	Departamento de Nariño.....	57
6.2.	MÉTODOS.....	59
6.2.1.	Aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i>	59
6.2.2.	Determinación del tipo de apareamiento.....	59
6.2.2.1.	Determinación <i>in vitro</i> del tipo de apareamiento.....	60
6.2.2.2.	Determinación Molecular del Tipo de Apareamiento Mediante el Uso de Marcadores Moleculares.....	61
6.2.3.	Determinación de la sensibilidad a i.a. Metalaxil y i.a. Cimoxanil.....	64
6.2.3.1.	Sensibilidad de <i>Phytophthora infestans</i> a los i.a Metalaxil y Cimoxanil – metodología <i>in leaf</i>	65
6.2.3.2.	Sensibilidad de <i>Phytophthora infestans</i> a los i.a Metalaxil y Cimoxanil – metodología en placa.....	66
6.2.4.	Análisis Estadístico.....	68
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
7.1.	Determinación del tipo de apareamiento.....	70
7.1.1.	Determinación <i>in vitro</i> del Tipo de Apareamiento.....	70

7.1.2. Determinación del Tipo de Apareamiento en <i>P. infestans</i> Mediante Marcadores CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence).....	74
7.2. Determinación de la sensibilidad a i.a. Metalaxil y Cimoxanil.....	80
7.2.1. Ingrediente Activo Metalaxil.....	81
7.2.2. Ingrediente Activo Cimoxanil.....	90
8. CONCLUSIONES	
9. RECOMENDACIONES	
10. LITERATURA CITADA	
11. ANEXOS	

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora infestans</i> (Fuente: NCBI: <i>Taxonomy</i> ID: 4787).....	30
Tabla 2. Información de los aislamientos utilizados en las pruebas <i>in vitro</i> y molecular (CAPS) para la determinación de tipo de apareamiento (GENPAT, 2011).....	120
Tabla 3. Clasificación de sensibilidad por EC-50 (Wang <i>et al.</i> , 2002).....	67
Tabla 4. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 5.613E-38) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología <i>in leaf</i>	125
Tabla 5. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 1.68E-09) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología en placa.....	126
Tabla 6. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 0.1248) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología <i>in leaf</i>	127

Tabla 7. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 1.684E-09) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología en placa.....	128
Tabla 8. Esporulación, área de crecimiento y tasa de esporulación de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> en agar tomate-arveja sin suplementar con i.a Metalaxil.....	129
Tabla 9. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 3.979E-44) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología <i>in leaf</i>	130
Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 9.164E-10) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología en placa.....	131
Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 0.3379) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología <i>in leaf</i>	132
Tabla 12. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 6.398E-09) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología en placa.....	133

Tabla 13. Esporulaci3n, 1rea de crecimiento y tasa de esporulaci3n de aislamientos de *Phytophthora infestans* en agar tomate-arveja sin suplementar con i.a Cimoxanil.....134

Tabla 14. Clasificaci3n de aislamientos de *Phytophthora infestans* aislada de *Solanum betaceum* seg3n los valores de dosis media efectiva (EC-50) del ingrediente activo Cimoxanil en metodolog3a *in leaf* y placa.....135

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Esporangios y Micelio <i>Phytophthora infestans</i> (Fuente: esta investigación).....	32
Figura 2. Oospora de <i>Phytophthora infestans</i> (Fuente: Perez & Forbes - CIP Perú, 2008).....	33
Figura 3. Ciclo de vida <i>Phytophthora infestans</i> (Fuente: Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996).....	35
Figura 4. Productos de PCR amplificados a partir de ADN de <i>P. infestans</i> utilizando los primers W16-1/2 (Fuente: Mazáková <i>et al.</i> , 2010).....	40
Figura 5. Localización del Departamento del Putumayo y municipios muestreados en el estudio (Fuente: Mideros, 2008).....	56
Figura 6. Localización del Departamento de Nariño (Fuente: Mideros, 2008).....	58
Figura 7. Esporangios de <i>Phytophthora infestans</i> encontrada en montajes de tipo de apareamiento (Fuente: Esta investigación).....	71

Figura 8. Distribución de haplotipos de <i>Phytophthora infestans</i> en la región norte de los Andes (Cox1, β -tubulina, Ras y Avr3a) (Fuente: Cárdenas <i>et al.</i> , 2011).....	72
Figura 9. ADN de <i>P. infestans</i> extraído mediante el protocolo descrito por Griffith y Shaw (1998).....	74
Figura 10. Amplificación con los primers W16-1 y W16-2.....	75
Figura 11. Digestión de los productos de amplificación con la enzima de restricción <i>HaeIII</i>	76
Figura 12. Fragmentos amplificados por PCR a partir de ADN de 19 aislamientos de <i>P. infestans</i> utilizando los primers W16-1 y W16-2 (A) y restricción de la digestión usando la enzima <i>HaeIII</i> (D) (POX 102: aislamiento de referencia A2; 3210: aislamiento de referencia A1; Cl-: agua; GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).....	78
Figura 13. Crecimiento del aislamiento P9102 en diferentes concentraciones del ingrediente activo Metalaxil (A. Metodología <i>in leaf</i> . B. metodología en placa. Fuente: Esta investigación).....	82
Figura 14. Distribución de la frecuencia de porcentaje de inhibición en aislamientos de <i>P. infestans</i> en las diferentes concentraciones del ingrediente activo Metalaxil.....	83

Figura 15. Agrupamiento de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de Nariño y Putumayo con base en la EC-50 de Metalaxil (Metodología <i>in leaf</i>).....	89
Figura 16. Agrupamiento de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de Nariño y Putumayo con base en la EC-50 de Metalaxil (Metodología en placa).....	90
Figura 17. Crecimiento del aislamiento N9025 en diferentes concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil (A. Metodología <i>in leaf</i> . B. metodología en placa. Fuente: Esta investigación).....	92
Figura 18. Distribución de la frecuencia de porcentaje de inhibición en aislamientos de <i>P. infestans</i> en las diferentes concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil (metodología <i>in leaf</i>).....	93
Figura 19. Distribución de la frecuencia de porcentaje de inhibición en aislamientos de <i>P. infestans</i> en las diferentes concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil (metodología en placa).....	94
Figura 20. Sensibilidad de los aislamientos de <i>P. infestans</i> al ingrediente activo Cimoxanil (metodología <i>in leaf</i>).....	96
Figura 21. Agrupamiento de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de Nariño y Putumayo con base en la EC-50 de Cimoxanil (Metodología <i>in leaf</i>).....	101

Figura 22. Agrupamiento de aislamientos de *Phytophthora infestans* de Nariño y Putumayo con base en la EC-50 de Cimoxanil (Metodología en placa).....101

LISTA DE ANEXOS.

ANEXO A. Protocolos PCR amplificación CAPS tipo de apareamiento <i>Phytophthora infestans</i>	120
ANEXO B. Tabla 2. Información de los aislamientos utilizados en las pruebas <i>in vitro</i> y molecular (CAPS) para la determinación de tipo de apareamiento (GENPAT, 2011).....	121
ANEXO C. Protocolo Determinación Tipo De Apareamiento Mediante Marcadores Moleculares Tipo CAPS.....	124
ANEXO D. Tabla 4. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 5.613E-38) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología <i>in leaf</i>	125
ANEXO E. Tabla 5. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 1.68E-09) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología en placa.....	126
ANEXO F. Tabla 6. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 0.1248) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología <i>in leaf</i>	127

ANEXO G. Tabla 7. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 1.684E-09) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología en placa.....	128
ANEXO H. Tabla 8. Esporulación, área de crecimiento y tasa de esporulación de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> en agar tomate-arveja sin suplementar con i.a Metalaxil.....	129
ANEXO I. Tabla 9. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 3.979E-44) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología <i>in leaf</i>	130
ANEXO J. Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 9.164E-10) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología en placa.....	131
ANEXO K. Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 0.3379) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología <i>in leaf</i>	132
ANEXO L. Tabla 12. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 6.398E-09) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología en placa.....	133

ANEXO M. Tabla 13. Esporulaci3n, 1rea de crecimiento y tasa de esporulaci3n de aislamientos de *Phytophthora infestans* en agar tomate-arveja sin suplementar con i.a Cimoxanil.....134

ANEXO N. Tabla 14. Clasificaci3n de aislamientos de *Phytophthora infestans* aislada de *Solanum betaceum* seg3n los valores de dosis media efectiva (EC-50) del ingrediente activo Cimoxanil en metodolog3a *in leaf* y placa.....135

1. INTRODUCCIÓN.

La gota o tizón tardío es una de las enfermedades más devastadoras de cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) y tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*), su agente causal es el oomicete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (Jaramillo, 2003), el cual posee una gran plasticidad genética y altos niveles de virulencia (Silva *et al.*, 2009). La presencia del patógeno en este y otro tipo de cultivos de solanáceas ha causado grandes pérdidas económicas y su incidencia se atribuye a la ausencia de épocas definidas de siembra, la disponibilidad de fuentes constantes de inoculo en campo y a la ubicación de sus hospederos en regiones con condiciones ambientales favorables para el establecimiento de las poblaciones del patógeno, (Garrett, 2001; Zapata, 2002; Jaramillo, 2003; García *et al.*, 2008), muchas de ellas más agresivas, con mayor éxito reproductivo y grados de virulencia diferentes a los inicialmente reportados (Samaucha & Gisi, 1987).

En Colombia, además de afectar papa (*S. tuberosum* y *S. phureja*) y tomate de mesa (*S. lycopersicum*), se ha reportado la presencia de *P. infestans* en otros hospederos de solanáceas como pepino dulce (*Solanum muricatum*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*), lulo (*Solanum quitoense*) y uchuva (*Physalis peruviana*) (Silva *et al.*,

2009; Vargas *et al.*, 2009; Cárdenas *et al.*, 2011), evidenciando la rápida evolución y adaptación del patógeno a nuevos hospederos y ambientes (Goss *et al.*, 2011).

Dentro de los cultivos frutícolas de clima frío en Colombia, y en especial en los departamentos de Nariño y Putumayo, el tomate de árbol constituye una alternativa de gran importancia socioeconómica como cultivo principal o de rotación ofreciendo excelentes perspectivas para la generación continua de ingresos en el mercado nacional y como generador de divisas en algunos mercados internacionales, sin embargo se ve seriamente afectado o disminuido en términos reales por el incremento de diversos factores limitantes entre los que se destacan los problemas fitosanitarios (MADR, 2006).

A pesar de que *P. infestans* presenta una elevada especificidad de hospedero, el alto potencial infeccioso del patógeno hace necesario la caracterización y monitoreo de diversas poblaciones, mediante el uso de marcadores fenotípicos y genotípicos, que permiten evaluar el nivel de variación de las poblaciones con respecto a su hospedante, la identificación de fenotipos particulares con resistencia a fungicidas y niveles de agresividad, aspectos importantes dado que el patógeno es considerado una amenaza por la aparición de nuevas epidemias favorecidas por su variabilidad y su presencia en hospederos no convencionales como tomate de árbol (*Solanum betaceum*) (Oliva *et al.*, 2002).

En la actualidad, los estudios en *P. infestans* se han enfocado en la caracterización del patógeno mediante el uso de marcadores fenotípicos y moleculares con el fin de conocer la estructura poblacional, variación intra-específica, flujo génico y eventos de migración, entre otros (Brasier, 1992; Fry & Goodwin, 1997; Goodwin & Drenth, 1997; Calderón *et al.*, 2002; Jaramillo, 2003; Páez *et al.*, 2005; Cárdenas *et al.*, 2011). Dentro de los marcadores ampliamente utilizados para la caracterización de las poblaciones se encuentra la determinación del tipo de apareamiento, el cual constituye una herramienta indispensable para comprender el comportamiento reproductivo del patógeno, dicho marcador puede estudiarse desde el enfoque fenotípico mediante el cruce de aislamientos *in vitro* o con la utilización de marcadores moleculares, los cuales permiten establecer el tipo de compatibilidad que se presenta en los aislamientos de la población (Judelson, 1996a; Judelson, 1996b; Oliva *et al.*, 2002). Otro marcador fenotípico ampliamente empleado es la sensibilidad a fungicidas, el cual determina la respuesta del patógeno a diferentes dosis de los ingredientes activos o de los fungicidas comerciales, permitiendo establecer las dosis medias efectivas y una línea base para un control más eficiente de la enfermedad.

Con el fin de conocer el comportamiento reproductivo y la sensibilidad a los ingredientes activos de dos fungicidas ampliamente utilizados en campo, los objetivos del presente trabajo fueron determinar la frecuencia de los tipos de apareamiento mediante el uso de marcadores fenotípicos y moleculares, y la evaluación del grado de sensibilidad *in vitro* a los ingredientes activos metalaxil y

cimoxanil en aislamientos de *P. infestans* colectados de cultivos de tomate de árbol en las zonas productoras de los departamentos de Nariño y Putumayo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La familia Solanaceae es reconocida mundialmente por su importancia en términos de vegetales cultivados y el amplio rango de utilidad agronómica de sus especies, que incluyen al importante género *Solanum* (The International Solanaceae Genome Project, 2004); en Colombia, una de las especies comúnmente cultivada es el tomate de árbol (*Solanum betaceum*). En los departamentos de Nariño y Putumayo este cultivo ha sufrido marcadas variaciones en su producción, debido a la alta susceptibilidad a problemas de tipo fitosanitario (Agrios, 2005; Carreño *et al.*, 2007), favorecidos por la prevalencia de factores ambientales propicios para la propagación de la enfermedad y los cuales dificultan el control de *P. infestans*, causante del “tizón tardío” o “gota” en tomate de árbol.

En los últimos años trabajos relacionados con aspectos ecológicos de la enfermedad indican que existe una amplia dinámica en las poblaciones del patógeno (Páez *et al.*, 2005). Para el caso de Latinoamérica, estudios realizados en tomate de árbol por Oliva (2009) en Ecuador, son consistentes con la hipótesis de que la variabilidad genética se debe posiblemente a eventos de reproducción sexual intraespecífica o interespecífica entre especies que se encuentran estrechamente relacionadas como es

el caso de *P. infestans* y *P. andina*. Para el caso de Colombia y en especial en los departamentos de Nariño y Putumayo, las poblaciones de *P. infestans* que atacan *S. betaceum* son poco conocidas, sin embargo, estudios realizados por Mideros (2008) en tomate de árbol en la zona, indican que existe más de una población del patógeno atacando este tipo de cultivo y que estas poblaciones presentan elevados niveles de agresividad respecto a poblaciones asociadas al linaje EC-3, reportado para este hospedero en Ecuador (Adler *et al.*, 2004). Adicionalmente estudios realizados por el grupo Genética y Evolución de Organismos Tropicales – GENPAT_(2011) reportaron que existe cierto grado de variabilidad genética y elevados niveles de virulencia en las poblaciones del patógeno que atacan tomate de árbol en el Sur Occidente Colombiano.

Dichos cambios en las poblaciones del patógeno se deben posiblemente a la preferencia de hospedero o estrategia reproductiva (Perez *et al.*, 2001; Oliva *et al.*, 2002); en la mayoría de los casos, los cambios en el tipo de apareamiento han complicado el control del patógeno, lo cual generalmente se evidencia en poblaciones más agresivas y resistentes a fungicidas de alta especificidad como metalaxil, este tipo de alteraciones son atribuibles tanto a recombinaciones genéticas a través de la reproducción sexual, como también a migraciones directas de nuevos genotipos de otras regiones (Gisi & Cohen, 1996; Goodwin & Drenth, 1997), mutaciones estables y heredables, parasexualidad o procesos de selección (Pérez & Forbes, 2008). Como resultado de estos eventos se originan nuevos genotipos más diversos y agresivos

(Sujkowski *et al.*, 1994; Fry *et al.*, 1993) que pueden desplazar con mayor facilidad a las poblaciones locales ya establecidas (Gavino *et al.*, 2000).

Las situaciones expuestas anteriormente, sugieren que es importante contemplar las fuentes de variación tanto asexual como sexual (Raigosa *et al.*, 2009), así como la evaluación de la sensibilidad a fungicidas (Wang *et al.*, 2002) para el análisis poblacional y el monitoreo de las poblaciones a mediano y largo plazo con el fin de establecer su dinámica. En este sentido, la evaluación del tipo de apareamiento y la sensibilidad a fungicidas en poblaciones de *P. infestans* sensu lato se convierten en una herramienta indispensable para comprender aspectos biológicos del patógeno. Teniendo en cuenta lo anterior, se propuso un estudio de caracterización, mediante el uso de marcadores fenotípicos (determinación del tipo de apareamiento mediante técnicas *in vitro* y sensibilidad a los i.a. metalaxil y cimoxanil) y marcadores moleculares (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences - CAPS) en poblaciones de *P. infestans* aisladas de *Solanum betaceum* en las zonas productoras de Nariño (La Unión, Buesaco, Pasto, Ipiales, Iles, Imues, Gualmatan, Aldana, Guachucal, Cumbal, Sapuyes, Tuquerres) y Putumayo (Santiago, Colon, San Francisco, Sibundoy). Con este proyecto se pretende resolver las siguientes preguntas de investigación:

- Cuál es la frecuencia de los diferentes tipos de apareamiento en las poblaciones de *Phytophthora infestans* sensu lato aisladas de tomate de árbol?

- Cuál es el grado de sensibilidad a los ingredientes activos Cimoxanil y Metalaxil en los aislamientos de *Phytophthora infestans* sensu lato procedentes de los departamentos de Nariño y Putumayo?

3. OBJETIVOS DEL PROYECTO.

3.1. Objetivo General.

Caracterizar mediante tipo de apareamiento y sensibilidad a los ingredientes activos metalaxil y cimoxanil las poblaciones de *Phytophthora infestans* sensu lato en las zonas productoras de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) del Sur Occidente Colombiano.

3.2. Objetivos Específicos.

- Determinar la frecuencia de los tipos de apareamiento A1 y A2 en aislamientos de *Phytophthora infestans* sensu lato obtenidos de tomate de árbol provenientes de las zonas productoras en los municipios de Nariño (La Unión, Buesaco, Pasto, Ipiales, Iles, Imues, Gualmatan, Aldana, Guachucal, Cumbal, Sapuyes y Tuquerres) y Putumayo (Santiago, Colon, San Francisco y Sibundoy).

- Determinar el grado de sensibilidad de los aislamientos de *Phytophthora infestans* sensu lato obtenidos de *Solanum betaceum* a los ingredientes activos metalaxil y cimoxanil.

4. ESTADO DEL ARTE.

4.1. Importancia de las Solanáceas.

La familia Solanaceae incluye más de 3000 especies muchas de las cuales se encuentran distribuidas en las regiones Andina y Amazónica de América del Sur. Para el caso de las Solanáceas, se considera que el centro de origen se encuentra cerca de Ecuador, y por lo tanto estas especies no fueron perturbadas por las glaciaciones, lo cual les ha permitido acumular una gran variación genética adaptativa para diferentes nichos ecológicos, esto se ve reflejado en que dichas especies se encuentran distribuidas en diferentes hábitats que incluyen desde bosques tropicales hasta tierras altas (The International Solanaceae Genome Project, 2004).

La mayoría de las plantas que se encuentran dentro de esta familia han sido sometidas a procesos de domesticación mediante selección intensiva por parte del ser humano, lo cual ha conllevado a que sea reconocida mundialmente por su importancia en términos de vegetales cultivables y por el amplio rango de utilidad agronómica de sus especies (The International Solanaceae Genome Project, 2004).

Como país tropical, Colombia puede garantizar la producción permanente de muchas especies de esta familia, que se presentan como una alternativa prometedora de cultivos con mejores posibilidades de competencia en escenarios de mercados globalizados. Sin embargo, la alta susceptibilidad a patógenos de las Solanáceas afecta de forma significativa los cultivos y puede causar grandes pérdidas en la producción de vegetales y frutos (Carreño *et al.*, 2007).

En Colombia, los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), papa criolla (*Solanum phureja*), tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*), uchuva (*Physalis peruviana*), lulo (*Solanum quitoense*), tomate de árbol (*Solanum betaceum*), ají (*Capsicum* sp.), pimentón (*Capsicum annum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) son los principales cultivos de solanáceas de importancia económica (Carreño *et al.*, 2007), es así como en la última década, varias especies de frutales andinos exóticos como la uchuva, el tomate de árbol y el lulo, se han convertido en cultivos importantes tanto para el consumo interno como para la exportación al mercado internacional (Vargas *et al.*, 2009; Lagos B *et al.*, 2011).

En el caso de Nariño y Putumayo, la mayoría de las frutas andinas presentan un gran potencial para incluirlas en sistemas de cultivo con fines de exportación, debido a la gran aceptación de frutas exóticas. Sin embargo, la mayoría de estas frutas aún no se han consolidado dentro de los sistemas de producción del país. En estas zonas a pesar

de contar con ofertas ambientales óptimas para el cultivo del tomate de árbol, aún no se han establecido variedades comerciales, por lo tanto, los agricultores se ven enfrentados a diversos problemas, entre ellos los fitosanitarios, que no permiten explotar el potencial del frutal (Lagos B *et al.*, 2011; Tafur, 2006).

4.2. Clasificación Taxonómica, Características Morfológicas, Biología y Distribución de *Phytophthora infestans*.

P. infestans, patógeno que causa la enfermedad conocida como tizón tardío en diferentes especies de Solanáceas, incluyendo el tomate de árbol, se constituye como uno de los mayores problemas debido a las pérdidas económicas que ocasiona durante la producción de estos cultivos convirtiéndose en uno de los fitopatógenos más estudiados a nivel mundial (Carreño *et al.*, 2007).

4.2.1. Clasificación Taxonómica de *Phytophthora infestans*.

En la actualidad, *P. infestans* se encuentra clasificado taxonómicamente dentro de la clase Oomycetes (Tabla 1); sin embargo, debido a su hábito de crecimiento filamentoso, nutrición por absorción, y reproducción a través de esporas, inicialmente los oomycetes fueron considerados como hongos (Fry & Grünwald, 2010).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Phytophthora infestans* (Fuente: NCBI: *Taxonomy ID: 4787*)

TAXÓN	NOMBRE
Súper-Reino	Eukaryota
Reino	Protista
Phylum	Stramenopiles
Clase	Oomycetes
Orden	Peronosporales
Familia	Phytiaceae
Genero	Phytophthora
Especie	<i>Phytophthora infestans</i>

Utilizando análisis filogenéticos se ha determinado que los oomycetes están más estrechamente relacionados con las algas pardas y las plantas verdes que con los hongos propiamente dichos. Los oomycetes del género *Phytophthora* presentan un número considerable de características biológicas que los diferencian de otros microorganismos eucarióticos, por ejemplo no presentan pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en los gametos masculinos y zoosporas las cuales se encuentran contenidas en estructuras conocidas como esporangios, presentan paredes formadas por β -glucanos o polímeros similares a celulosa, núcleos vegetativos diploides y tener hábitos acuáticos y terrestres (Jaramillo, 2003).

Las principales diferencias del género *Phytophthora* con los hongos, se basan en la morfología de las crestas mitocondriales, la bioquímica de las paredes celulares las cuales contienen microfibrillas de celulosa en vez de quitina, la carencia de hipoxidación del esqueleto de esteroides y diferencias en las vías metabólicas. Para este género se han reportado más de 60 especies que actúan como patógenos de plantas dentro de las cuales se encuentra *P. infestans*, agente causal del tizón tardío en la papa y el tomate (Erwin & Ribeiro, 1996; Kamoun, 2003).

4.2.2. Características Morfológicas de *Phytophthora infestans*.

P. infestans difiere de muchos otros miembros de la familia Pythiaceae por la formación de estructuras características del género. El micelio de *P. infestans* está compuesto por filamentos hialinos, ramificados y cenocíticos (no septados), con un diámetro entre los 5 y 8 μm en el cual se forman los esporangióforos. Las diferentes especies de la familia desarrollan estructuras asexuales denominadas esporangios o zoosporangios hialinos los cuales son producidos en los esporangióforos, estas estructuras se caracterizan por ser semipapiladas, presentar paredes delgadas, pedicelos cortos y forma limoniforme, (Fig. 1); estos esporangios germinan por medio de zoosporas a temperaturas entre los 12°C y 15°C, sin embargo a temperaturas superiores los esporangios germinan directamente produciendo un tubo germinal; cada uno de los esporangios produce entre tres y ocho zoosporas

biflageladas y con forma piriforme, las cuales son diseminadas cuando se rompe la pared del esporangio a nivel de la papila (Agrios, 1986; Erwin & Ribeiro, 1996; Turkesteen, 2000; Kamoun, 2003).



Figura 1. Esporangios y Micelio *Phytophthora infestans* (Aumento: 40X; Fuente: esta investigación)

Otro tipo de esporas características del género son las oosporas, cuerpos redondos de paredes gruesas (Fig. 2) con un diámetro aproximado de 24 a 26 nm, las cuales se forman cuando se encuentran los dos tipos de apareamiento o compatibilidad, estas estructuras germinan por medio de un tubo el cual produce un esporangio o en algunas ocasiones forma micelio directamente (Agrios, 1986; Erwin & Ribeiro, 1996; Turkesteen, 2000). Estas estructuras pueden ser de dos tipos, si el oogonio crece

sobre el anteridio éste se denomina anfiginio y si el anteridio rodea al oogonio, en su parte basal cerca al pedicelo, se conoce como paraginio (Jaramillo, 2003).

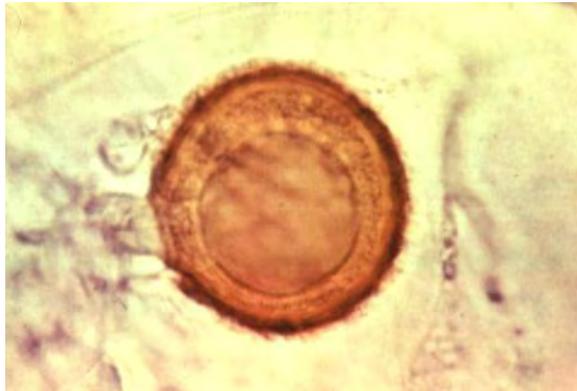


Figura 2. Oospora de *Phytophthora infestans* (Fuente: Pérez & Forbes - CIP Perú, 2008)

4.2.3. Biología de *Phytophthora infestans*.

P. infestans es un patógeno heterotálico y hemibiotrófico obligado en condiciones naturales y agrícolas (Fry, 2008). El ciclo de vida de este oomycete puede presentar dos fases, asexual o sexual (Fig. 3), sin embargo la más frecuente es la fase asexual, por medio de esporangios y zoosporas las cuales no pueden sobrevivir en el suelo o restos de plantas enfermas que hayan muerto a diferencia de las oosporas producto de

la reproducción sexual que sirven como fuente de inoculo a largo plazo tanto en el suelo como en las plantas.

El ciclo asexual permite un crecimiento rápido de la población en el tejido del hospedero susceptible. Los esporangios son producidos en esporangióforos que crecen a partir de tejido infectado; los esporangios son fácilmente dehiscentes y son dispersados por vía aérea a otros tejidos de la planta (Aylor *et al.*, 2001), o también por agua, es así como los esporangios pueden germinar ya sea a través de un tubo germinativo a temperaturas altas entre 20 y 25°C, o por la liberación de zoosporas a temperaturas más bajas entre 10 y 15°C. Estas zoosporas biflageladas son móviles por un periodo de tiempo corto (aproximadamente 60 minutos) antes de enquistarse y germinar directamente a través de un tubo el cual penetra tejidos de hoja o tallo (Fry, 2008).

En el caso de la fase sexual, como organismo heterotálico es necesaria la presencia de ambos tipos de apareamiento denominados A1 y A2. Las esporas se forman a medida que cada tipo de apareamiento responde a la hormona inducida por el tipo de apareamiento contrario, produciendo un oogonio y un anteridio. La meiosis ocurre inmediatamente antes del desarrollo de gametangios, la cariogamia se da entre estos dos núcleos haploides, formando una oospora diploide uninucleada de paredes gruesas (Smart *et al.*, 2000). Las oosporas se forman cuando los micelios con distinto tipo de apareamiento A1 y A2, crecen juntos y uno de ellos puede formar células masculinas conocidas como anteridio, y el otro células femeninas conocidas como

oogonio; esta última crece a través del anteridio permitiendo la fertilización, y el oogonio fertilizado se convierte en una espora de reposo que le permite al patógeno resistir condiciones desfavorables. Las oosporas desarrollan un tubo germinativo sobre el cual se forma un zoosporangio similar a los de la reproducción asexual, el cual germina y las zoosporas resultantes pueden iniciar de nuevo el ciclo de vida asexual (Henflig, 1987 citado en Jaramillo, 2003).

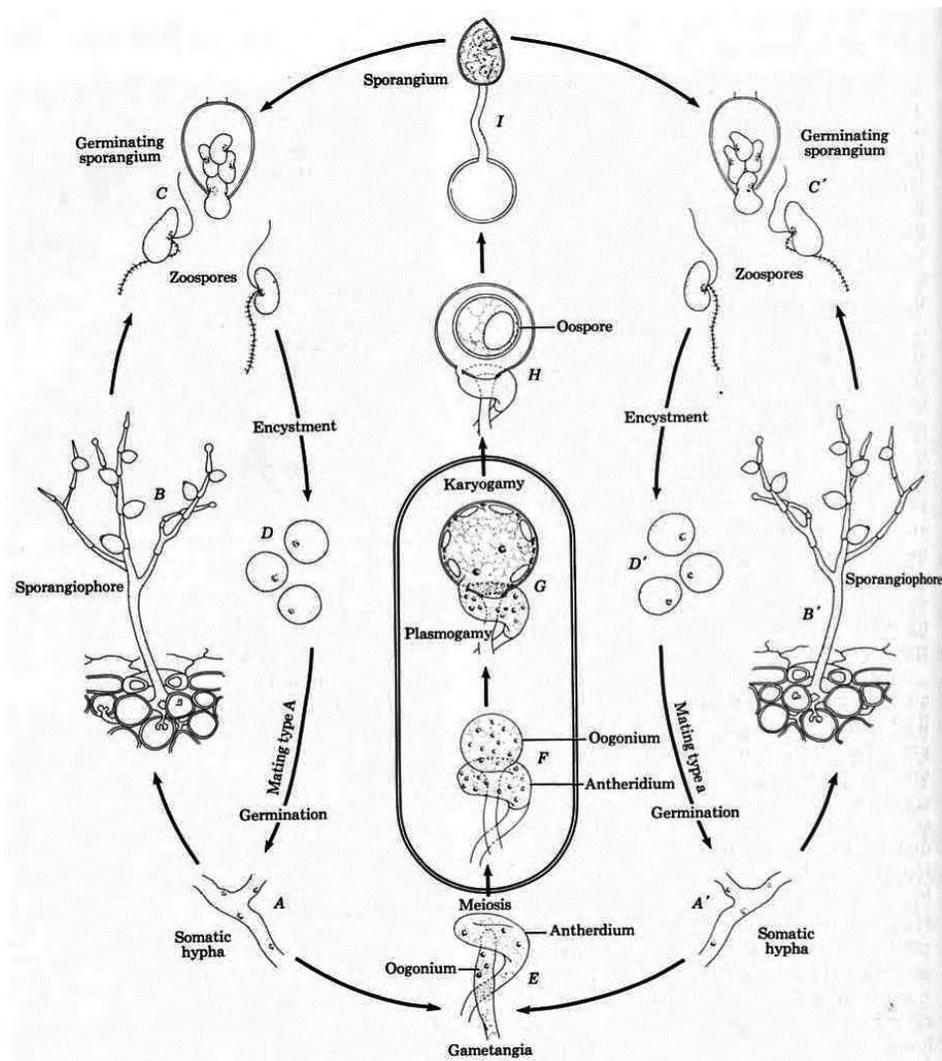


Figura 3. Ciclo de vida *Phytophthora infestans* (Fuente: Alexopoulos *et al.*, 1996)

4.2.4. Distribución de *Phytophthora infestans*.

Con relación a la distribución, *P. infestans* se originó en México como patógeno en plantas nativas de la familia Solanaceae, aunque no en los ancestros andinos de la papa o tomate de mesa. De México, *P. infestans* migro en varios episodios al resto del mundo; aparentemente la primera migración tuvo lugar en la primera mitad del siglo XIX y culminó en Europa donde devastó los cultivos de papa y provocó las hambrunas de Irlanda entre 1845 y 1846; posteriormente, se reportó en Estados Unidos y el resto de los continentes (Fry *et al.*, 1993; Ristaino, 2002; Grunwald & Flier, 2005).

En las poblaciones de *P. infestans* de México han estado presentes los dos tipos de apareamiento (A1 y A2) necesarios para la reproducción sexual; como este tipo de reproducción permite la recombinación genética, las poblaciones del patógeno en este país son muy complejas. Aparentemente, en el inóculo de *P. infestans* que migró originalmente de México hacia Europa en 1840 solo estaba representado el tipo de apareamiento A1, por lo tanto la reproducción de las poblaciones establecidas subsiguientemente era únicamente asexuales. En consecuencia, las poblaciones del patógeno fuera de México tenían una variabilidad mínima y se consideraban un solo clon; en el año de 1984 en Suiza se reportó por primera vez el tipo de apareamiento A2, al parecer este migró de México a Europa en 1976, en un cargamento de papa, y

posteriormente de Europa se dispersó a otras partes del mundo (Goodwin *et al.*, 1996).

En la actualidad las poblaciones con tipo de apareamiento A2 se encuentran distribuidas en todo el mundo (Tooley *et al.*, 1985; Goodwin *et al.*, 1992), incluyendo Europa (Drenth *et al.*, 1994; Sujkowski *et al.*, 1994; Turkensteen *et al.*, 2000), Norte América (Goodwin & Fry, 1995; Miller *et al.*, 1997; Gavino *et al.*, 2000) y Asia (Ghimire *et al.*, 2003), donde además se tiene evidencia de reproducción sexual entre las poblaciones.

Para el caso de Colombia los monitoreos en aislamientos colectados de papa y otros hospederos hasta el año 2004 solamente habían detectado la presencia del tipo de apareamiento A1, indicando que el oomycete se reproduce asexualmente (Carreño *et al.*, 2007). No obstante, en el año 2009 se reporta por primera vez la presencia del tipo de apareamiento A2 en *Physalis peruviana* para la región central de Colombia, en el resto del país no se conocen reportes de poblaciones tipo A2 (Vargas *et al.*, 2009); sin embargo, no se descarta la presencia del tipo de apareamiento A2 en poblaciones aisladas de otros hospederos que aún no han sido evaluados.

4.3. Tipo de apareamiento en *Phytophthora infestans*.

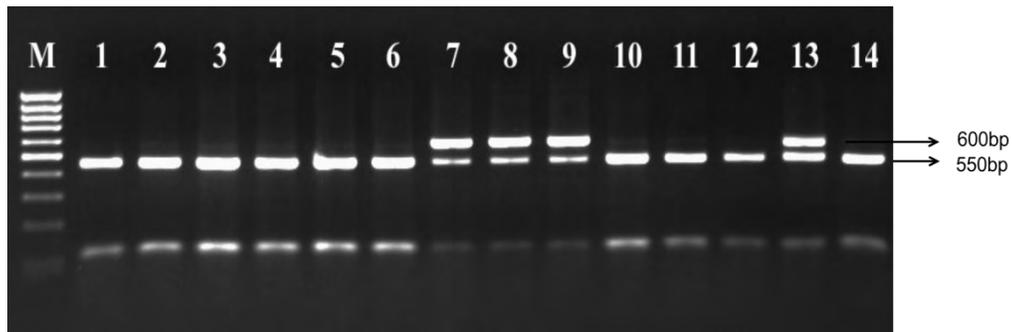
P. infestans pertenece a un grupo de organismos que tienen la capacidad de reproducirse tanto por medios asexuales como sexuales, siendo este último, un mecanismo determinante en la biología y la epidemiología del patógeno, aunque la reproducción asexual explica en gran medida el desarrollo y la distribución de esta especie (Drenth *et al.*, 1995; Sujkowski *et al.*, 1994; Mazáková *et al.*, 2010). Para los patógenos heterotálicos como *P. infestans*, la presencia de los dos tipos de apareamiento, designados arbitrariamente como A1 y A2, es necesaria para la formación de oosporas sexuales (Gallegly & Galindo, 1958). Cada tipo de apareamiento es bisexual, capaz de producir oogonios y anteridios a partir de la diferenciación de su micelio vegetativo; además de ser considerados como grupos de compatibilidad y no formas sexuales (Gallegly & Galindo, 1960) ya que el anteridio u oogonio de un tipo puede aparearse con el oogonio o anteridio, respectivamente, del tipo opuesto. Cuando ambos tipos de apareamiento están presentes, ocurre la fusión entre gametangios de tipos opuestos, lo cual resulta en reproducción sexual y finalmente la formación de una oospora (Judelson, 1996b; Erwin & Ribero, 1996; Fay & Fry, 1996; Oliva *et al.*, 2002). Este tipo de reproducción le proporciona al patógeno la supervivencia no parasitaria de las zoosporas y nuevas combinaciones de genes, que le confieren ventajas ecológicas; sin embargo, este organismo ha provocado grandes epidemias reproduciéndose asexualmente como parásito obligado,

causando catástrofes con marcadas consecuencias económicas y sociales (Jaramillo, 2003).

La determinación del tipo de apareamiento en *P. infestans* se ha convertido en un factor importante para establecer las posibles causas de la variación genética en las poblaciones; tradicionalmente estas evaluaciones se llevan a cabo *in vitro* apareando el aislamiento desconocido con cada uno de los aislamientos control del tipo de apareamiento A1 o A2 (García, 1997). Sin embargo en la actualidad otra de las alternativas para la determinación del tipo de apareamiento, sin la necesidad de utilizar cepas vivas del patógeno es el uso de marcadores moleculares; en el año de 1995 Judelson y colaboradores encontraron una serie de marcadores de ADN ligados a los determinantes de tipo de apareamiento en el oomycete, todos estos marcadores se encuentran en una sola región delimitada, un único *locus* que determina ambos tipos de apareamiento, dicha región presenta aproximadamente 100kb y segregación no mendeliana con el fin de contar con un sistema equilibrado para *loci* letales que se encuentran cerca del *locus* de tipo de apareamiento.

Basado en el conocimiento de este *locus*, Judelson y colaboradores (1995) diseñaron primers (W16-1 y W16-2) para llevar a cabo una reacción de PCR utilizando la técnica Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS), y el producto de interés amplificado es digerido con la enzima de restricción *HaeIII*, revelando dos bandas de

600 y 550bp ligadas al carácter A1 y una banda de 550bp ligada al carácter A2 (Fig. 4), estos patrones de bandeo permiten distinguir ambos tipos de apareamiento en *P. infestans* (Judelson *et al.*, 1995; Kim & Lee, 2002; Mazáková *et al.*, 2010; Gisi *et al.*, 2010).



Carril M, MassRuler™ DNA Ladder Low Range (Fermentas); carriles 1-6, 10-12, tipo de apareamiento A2; carriles 7-9, tipo de apareamiento A1; carril 13, aislado de referencia tipo de apareamiento A1; carril 14, aislado de referencia tipo de apareamiento A2.

Figura 4. Productos de PCR amplificados a partir de ADN de *Phytophthora infestans* utilizando los primers W16-1/2 (Fuente: Mazáková *et al.*, 2010).

4.4. Sensibilidad de *Phytophthora infestans* a Fungicidas.

Respecto a la sensibilidad de *P. infestans* a los diferentes fungicidas se puede decir que el manejo y control de la gota o tizón tardío no es eficiente con productos orgánicos o biológicos, razón por la cual las medidas de prevención y mejoramiento genético de los hospederos se integran con el uso de fungicidas de acción protectante

y/o sistémica. Sin embargo, la efectividad de algunos de estos productos se ha reducido gradualmente como resultado de la aparición de cepas resistentes en las poblaciones del patógeno (Jaramillo, 2003).

La sensibilidad o resistencia a fungicidas por parte de *P. infestans*, se presenta como una variación genética en los organismos, la cual se manifiesta en la reducción de sensibilidad a una molécula química por la disminución en la tasa de ingreso del fungicida a las células, la falta de afinidad química con la molécula blanco o la detoxificación del compuesto por parte del patógeno. Estos cambios generalmente se encuentran asociados con la presencia de mutaciones genéticas que ocurren en uno o en varios genes como resultado de la presión de selección (Escudero *et al.*, 2009).

Por otra parte, para el control de esta enfermedad es importante conocer varios factores: la región donde se cultiva el hospedero, las condiciones ambientales, la variedad sembrada y las prácticas culturales empleadas (Pérez & Forbes, 2008). Igualmente, para su manejo se han utilizado diferentes métodos siendo el control químico la herramienta y estrategia más utilizada, pues no se han establecido otros sistemas de control de mayor eficacia, ya que el patógeno evoluciona permanentemente hacia poblaciones cada vez más agresivas y resistentes a los fungicidas de tipo sistémico.

4.4.1. Fungicidas utilizados para el control químico de *Phytophthora infestans*.

Dos tipos de fungicidas son utilizados para el control químico del tizón tardío o gota, los de tipo protectante (llamados también de contacto o residuales) y los sistémicos. Los de tipo protectante son comúnmente referidos como fungicidas protectores o preventivos y los de tipo sistémico como curativos (Jaramillo, 2003).

Los fungicidas de tipo protectante, afectan las estructuras del patógeno en la superficie de la planta actuando en las fases de germinación y penetración, una vez que este ha entrado en la planta estos fungicidas no lo afectan; un buen control del tizón tardío con este tipo de fungicidas sólo se logra con aplicaciones frecuentes y a intervalos cortos entre las aplicaciones, debido a que son fácilmente lavados por las lluvias, lo cual también favorece la propagación de la enfermedad dado que se encuentran las condiciones adecuadas para la proliferación del patógeno (Fernández-Northcote *et al.*, 1999).

En el caso de los fungicidas sistémicos, estos penetran en la planta y se movilizan translaminarmente (del haz al envés) y acropetalamente (desde el punto donde cayeron hacia la parte superior de la planta). En este tipo de fungicidas, una aplicación constante y uniforme no es tan importante como en los fungicidas de tipo protectante. Luego de su aplicación el fungicida sistémico penetra en la planta y se

moviliza hacia las partes que no fueron alcanzadas en la aplicación. El intervalo entre aplicaciones de este fungicida puede ser distanciado en el tiempo debido a que no es lavado por las lluvias después de su aplicación, esta es una de las ventajas de frente a los fungicidas de tipo protectante; entre las desventajas de los fungicidas de tipo sistémico están su elevado costo y la selección e incremento de resistencia en el patógeno cuando se les utiliza inapropiadamente (Fernández-Northcote *et al.*, 1999).

En algunos casos la resistencia genética de las variedades de solanáceas cultivables permite la reducción de las aplicaciones de fungicidas (Jaramillo *et al.*, 2002; Kato & Shimanuki, 2002) sin que se afecte de manera significativa la producción, sin embargo no es posible lograr una buena producción sin control químico, especialmente cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la gota o tizón tardío en el follaje.

4.4.1.1. Metalaxil.

Metalaxil es un fungicida de tipo sistémico, el cual ha sido utilizado ampliamente como marcador fenotípico en las poblaciones de *P. infestans*, siendo el primer fungicida del grupo de las fenilamidas, introducido al mercado en 1977, los fungicidas de este grupo inhiben la esporulación y el desarrollo micelial, además de

interferir en la síntesis de ARN inhibiendo la actividad de la enzima ARN polimerasa. Este fungicida tiene poco efecto en la germinación y movilidad de los esporangios o zoosporas, debido a esto, la penetración y la formación de haustorios en la planta no son afectadas y el efecto fungitóxico que ejerce se presenta solo en el interior de la planta; (Fernández-Northcote *et al.*, 1999; Grünwald *et al.*, 2006).

Esta molécula de tipo sistémico es muy eficaz en el control de patógenos como *Phytophthora*, por su efecto curativo a bajas dosis en condiciones de alta presión de la enfermedad, sin embargo debido a su modo de acción específico y el uso continuo, se ejerce una alta presión de selección y como resultado la aparición de nuevas poblaciones del patógeno insensibles al compuesto (Nuninger *et al.*, 1995; Gisi & Cohen, 1996; Gisi *et al.*, 2000), debido probablemente a mutaciones puntuales y a la migración de nuevos genotipos de *Phytophthora* (Yun Lee *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2005).

4.4.1.2. Cimoxanil.

Dentro de los fungicidas de tipo sistémico se encuentra cimoxanil [1-(2-ciano-2-metoximinoacetil)-3-etilurea] el cual fue desarrollado por DuPont de Nemours (1976), este fungicida pertenece al grupo de las Cianoacetamida-oximas (Ziogas *et al.*, 1987); se caracteriza por presentar un movimiento translaminar y por

metabolizarse rápidamente, por lo cual su persistencia en los tejidos de la planta se limita a unos pocos días de actividad, teniendo que aplicarse a intervalos similares a los fungicidas de contacto (Erwin & Riveiro, 1996). Cimoxanil posee un modo de acción multisitio que incluye la inhibición de la síntesis de ADN, ARN, aminoácidos y lípidos, además de afectar la respiración celular y la permeabilidad de la membrana celular (Leroux, 1993 citado en García *et al.*, 2008; Escudero *et al.*, 2005). Estudios han reportado que esta molécula también actúa como un inductor de las defensas naturales de las plantas, que reaccionan mediante respuestas de hipersensibilidad y aumento en el espesor de las paredes celulares deteniendo el crecimiento micelial del oomicete (Howard *et al.*, 2000). Hasta el momento los trabajos de evaluación de sensibilidad de *P. infestans* al producto reportan un alto grado de susceptibilidad (Lagos, 2002; www.dupont.com; Jaramillo, 2003).

5. ANTECEDENTES.

Lamour y Hausbeck (2000) determinaron el potencial de cruzamiento, la presencia de oosporas y la heredabilidad de la sensibilidad a mefenoxam en poblaciones de *Phytophthora capsici*. Encontrando que los tipos de apareamiento A1 y A2 presentan una relación de 1:1 aproximadamente; de los aislamientos colectados en 1997 se encontró uno insensible y cuatro sensibles a mefenoxam; en el caso de los aislamientos colectados en 1998, el 55% de las 498 cepas analizadas fueron sensibles, 32% fueron intermedios y el 13% eran completamente insensibles a mefenoxam; con un análisis de Chi-cuadrado se determinó que la insensibilidad a este fungicida es segregada como un rasgo dominante incompleto que no se encuentra asociado con el tipo de apareamiento. Basándose en estos resultados, los autores concluyen que las oosporas probablemente juegan un papel imprescindible en la supervivencia de *P. capsici* y que la recombinación sexual puede afectar significativamente a la estructura de población del patógeno.

Knapova & Gisi (2002) analizaron fenotípica y genotípicamente la estructura de las poblaciones de *P. infestans* en 134 aislamientos de papa y tomate de mesa en Suiza y Francia. Mediante análisis moleculares, como la determinación del tipo de

apareamiento, se encontró que un 96% de los aislamientos de papa presentaron el tipo de apareamiento A1, mientras que en la mitad de los aislamientos de tomate de mesa se reportó el tipo de apareamiento A2, determinando que la estructura de la población de *P. infestans* en Europa pudo haber evolucionado a partir de procesos locales, como recombinación sexual, preferencia y selección de hospedero o a través de migraciones a larga distancia.

Jmour y Hamada (2006) evaluaron el tipo de apareamiento mediante técnicas CAPS y la resistencia a metalaxil en poblaciones de *P. infestans* aisladas de papa y tomate durante los años 2004 y 2005. Los resultados revelaron la presencia del tipo de apareamiento A2 por primera vez en Tunisia; en relación a la resistencia a fungicidas se observa que metalaxil está perdiendo su eficacia en campo y los resultados revelaron la presencia de un fenotipo resistente.

Vargas y colaboradores (2009) realizaron un estudio de caracterización fenotípica y molecular de 97 aislamientos colectados de *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *S. betaceum*, *S. phureja*, *S. quitoense* y *Physalis peruviana* en Colombia. Todos los aislamientos fueron analizados para el tipo de apareamiento, haplotipos mitocondriales, microsatélites y regiones ITS. A partir de esta caracterización se identificó un solo aislamiento con tipo de apareamiento A2 de *Physalis peruviana*, siendo el primer reporte para Colombia. De los 97 aislamientos se encontró que 96

corresponden al haplotipo mitocondrial IIa, en el caso del aislamiento con tipo de apareamiento A2 se encontró que presenta haplotipo mitocondrial Ia. Estos resultados tienen importantes implicaciones epidemiológicas para la producción de estos cultivos en Colombia, teniendo en cuenta que la alerta de eventos de reproducción sexual sugiere cambios en las estrategias de gestión integrada que sean adecuadas.

Silva y colaboradores (2009) realizaron una caracterización genética de aislamientos de *P. infestans* en las zonas productoras de papa en Colombia, en este estudio se analizaron haplotipos mitocondriales, tipo de apareamiento y el nivel de variación de las regiones ITS y 28S del ADN ribosomal, observando la presencia de un sólo haplotipo mitocondrial (IIa) y el tipo de apareamiento A1 en todos los aislamientos, lo que sugiere que en el patógeno posiblemente solo se presente el linaje clonal EC-1, por otro lado los resultados de la secuenciación de las regiones ITS y 28S fueron idénticas para todos los aislamientos y presentaron altos niveles de identidad con aislamientos de otros hospedantes y regiones del mundo. Con estos resultados concluyeron que las poblaciones de *P. infestans* no presentan una evidencia de reproducción sexual.

Oliva (2009), realizó estudios en Ecuador acerca de la dinámica de las oosporas y la estructura de las poblaciones de *P. infestans*, encontrando que es posible que pueda ser estimulada para producir oosporas en condiciones controladas, por parte de

especies que se encuentran estrechamente relacionadas, como es el caso de *P. andina*. Los resultados de este estudio indican que posiblemente se están presentando una gama de reacciones en cruces específicos e incluso entre especies y autofecundación, este último como mecanismo alternativo para una mayor variación genética en poblaciones del patógeno; además, se considera que estas oosporas podrían proporcionar una mayor supervivencia y capacidad de adaptación.

Mazáková y colaboradores en el año 2010, realizaron un estudio en poblaciones de *P. infestans* aisladas de cultivos de *Solanum tuberosum* en diferentes localidades de República Checa. Utilizando un total de 195 aislamientos colectados durante los años 2007 y 2008; los aislamientos fueron analizados por tipo de apareamiento con pruebas *in vitro*, marcadores CAPS y ensayos de PCR específicos. Los resultados de esta investigación mostraron que de las 195 cepas analizadas, el 28% eran del tipo de apareamiento A1 y el 75% correspondió al tipo de apareamiento A2, adicionalmente se encontró evidencia de estructuras sexuales (oosporas) las cuales fueron detectadas microscópicamente en tejido vivo, estos resultados confirman la reproducción sexual de *P. infestans* en la República Checa, sin embargo, son necesarias nuevas investigaciones para determinar el papel de las oosporas en la epidemiología del tizón tardío.

Corbiere y colaboradores (2010) realizaron una caracterización de *P. infestans* aislada de papa y tomate en Argelia durante los años 2007 a 2009; se evaluó tipo de apareamiento, sensibilidad a metalaxil, virulencia y agresividad, el crecimiento *in vitro* del micelio a cinco temperaturas y diversidad genotípica con 11 *loci* microsatélites. Los resultados indicaron la presencia de dos aislamientos de papa con tipo de apareamiento A2 resistentes a metalaxil y los aislamientos obtenidos de tomate con tipo de apareamiento A1 y sensibles al fungicida; en cuanto al crecimiento micelial se observó que en todos los aislamientos fue más rápido a 19°C; en el caso del parámetro de agresividad no se encontraron diferencias entre los aislamientos A1 y A2; finalmente los marcadores SSR revelaron una gran diversidad genotípica y diferentes grupos genéticos, relacionadas con el tipo de apareamiento y la especificidad de hospedero. Para el caso de Argelia se determinó que las poblaciones de *P. infestans* aisladas de papa podrían estar estrechamente relacionadas con poblaciones del patógeno de Europa Occidental y se plantea la posibilidad de que la presencia de ambos tipos de apareamiento en papa y tomate promueve la formación de oosporas en campo.

Gisi y colaboradores (2010) caracterizaron un total de 241 aislamientos de *P. infestans* colectados en ocho países de Europa mediante marcadores moleculares (genotipos SSR) y rasgos fenotípicos (sensibilidad a fungicidas, tipo de apareamiento y agresividad). Los resultados muestran que la distribución del tipo de apareamiento A1 se ha venido reemplazando por aislamientos A2 desde 1997 y que existe una alta

proporción de cepas resistentes a mefenoxam (MFX), sin embargo no existe una relación genética clara entre el tipo de apareamiento y la resistencia al fungicida; en cuanto a la agresividad se encontró que este parámetro fue ligeramente mayor para aislamientos resistentes a MFX en comparación con cepas sensibles. En conclusión, los resultados sugieren que la agresividad de los aislados no ha cambiado significativamente en los últimos 10 años, sin embargo, el tipo de apareamiento y la resistencia a fungicidas ha sufrido cambios drásticos en los países Europeos influyendo en la estructura de la población del oomycete.

Cardozo de Miranda y colaboradores (2010) caracterizaron 79 aislamientos de *P. infestans* colectados de *Solanum lycopersicum*, para tipo de apareamiento, sensibilidad a mefenoxam y virulencia. Todos los aislamientos fueron del tipo de apareamiento A1 y el 50% de los aislados fueron catalogados como resistentes, en relación a la agresividad no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados sugieren que es necesario implementar programas de mejoramiento de tomate en Brasil, considerando que a corto plazo, el uso de fungicidas es necesario para manejar el tizón tardío del tomate (principalmente cuando las condiciones ambientales favorecen los brotes de la enfermedad), pero la resistencia genética cuantitativa puede ser útil en la reducción de las aplicaciones de fungicida foliar para el control del patógeno.

Entre los años 2008 y 2011, el Grupo Genética y Evolución de Organismos Tropicales de la Universidad de Nariño - GENPAT, con el apoyo del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, realizó la caracterización genética y fenotípica de las poblaciones de *P. infestans* procedentes de tomate de árbol en las zonas productoras de Nariño y Putumayo. Dentro del estudio se evaluó tipo de apareamiento, sensibilidad a fungicidas, haplotipos mitocondriales, patogenicidad y marcadores microsatélites; encontrando en el caso de sensibilidad a fungicidas, que tanto para los ingredientes activos como para los productos comerciales que fueron evaluados, los aislamientos en su mayoría fueron catalogados como sensibles, en cuanto a los marcadores moleculares se observó que las poblaciones presentan haplotipo mitocondrial Ia pertenecientes al linaje clonal EC-3 característico de aislamientos de *S. betaceum* y con tipo de apareamiento A1, sin embargo algunos de los aislamientos presentaron la formación de estructuras diferentes a los típicos esporangios, lo cual hace necesario una posterior evaluación mediante el empleo de marcadores fenotípicos y moleculares con el fin de corroborar el tipo de apareamiento y posibles eventos de reproducción sexual en de las poblaciones del patógeno.

Céspedes y colaboradores en el año de 2013 realizaron una investigación con el fin de caracterizar fisiológica y molecularmente aislamientos de *P. infestans* en la región andina central de Colombia, evaluando los niveles de resistencia a mefenoxam y cimoxanil, virulencia y producción y viabilidad de oosporas en diferentes sustratos, adicionalmente determinaron la diversidad molecular en el gen de avirulencia Avr3a

y el gen de la β -tubulina. Los resultados indicaron que todos los aislamientos tuvieron la posibilidad de reproducirse sexualmente, además se reporta la presencia de todos los niveles de sensibilidad a mefenoxam y que el 48% de los aislamientos fueron resistentes, adicionalmente detectaron diversidad en las razas fisiológicas de los aislamientos y que a nivel genético la población se caracterizó por ser de tipo clonal.

6. METODOLOGÍA.

6.1. Área de estudio.

6.1.1. Departamento de Putumayo.

Se encuentra ubicado en el extremo sur del país, entre los 0° 40' latitud S y 1° 25' latitud N, y entre los 73° 50' y 77° 10' longitud O. Se caracteriza por presentar territorios que se extienden desde el piedemonte de la cordillera andina hasta la llanura amazónica. La zona específica para el muestreo en el departamento de Putumayo fue el Valle de Sibundoy, el cual se encuentra ubicado en la zona occidental del departamento, en límites con el departamento de Nariño y cubre una zona de aproximadamente 151.932 Km².

Las zonas de muestreo fueron los municipios de Santiago (1.15'N - 77.01'O), Colón (1.18'N - 76.88'O), San Francisco (1.18'N - 76.88'O) y Sibundoy (1.12'N - 76.55'O) (Fig. 5), en donde uno de los principales productos agrícolas que aportan a la economía de la región son los cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).

Estos municipios hacen parte de la región andino-amazónica del departamento del Putumayo, corresponden a una región montañosa, en la que sobresalen los cerros Patascoy y Putumayo con alturas que sobrepasan los 3.500 m y en la que se encuentran climas cálidos, medio, frío y páramo. La temperatura media anual es de 16.3°C, con T° máxima de 21.7°C y una T° mínima de 10.3°C, presenta humedad relativa del 85%, la precipitación anual es de 1.400 mm aproximadamente. Presenta una altitud que varía entre los 2.000 y 3.700 m.s.n.m. El brillo solar varía entre 500 y 700 h/año, con un valor anual de 669.9 h/año, con promedio mensual de 55.83 h/mes; el período de mayor expresión se presenta en el mes de enero 81.52 h/año, coincidiendo con la época de verano o de pocas lluvias y el menor registro en el mes de abril con 35.01 h/mes, en la época de intensas lluvias (<http://www.putumayo.gov.co>).

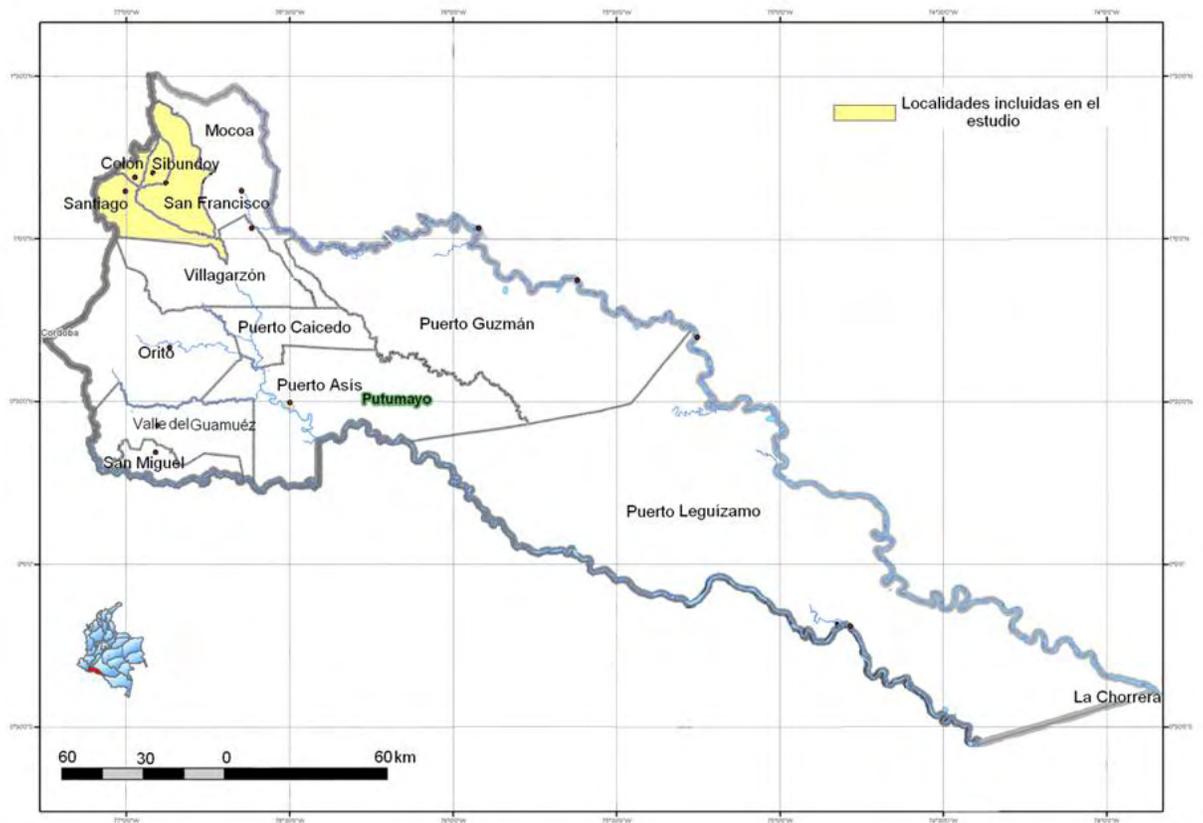


Figura 5. Localización del Departamento del Putumayo y municipios muestreados en el estudio (Fuente: Mideros, 2008).

6.1.2. Departamento de Nariño.

El departamento de Nariño está situado en el extremo suroeste del país, en el cual se distinguen tres unidades fisiográficas: la llanura del Pacífico, la región andina y la vertiente amazónica. El relieve del departamento se caracteriza por la presencia de temperaturas cálidas, templadas, frías y de páramo. Las lluvias en el área interandina son superiores a los 3.000 mm, disminuyendo en el altiplano nariñense donde son inferiores a los 1.000 mm; en el piedemonte amazónico las lluvias son superiores a los 4.000 mm (www.asohofrucol.com).

Para el caso del Departamento de Nariño, las zonas de muestreo fueron consideradas teniendo en cuenta la presencia de cultivos de tomate de árbol que se encontraban afectados por *P. infestans*. Los municipios en donde se realizaron los muestreos fueron La Unión, Buesaco, Pasto, Ipiales, Iles, Imues, Gualmatan, Aldana, Guachucal, Cumbal, Sapuyes, Tuquerres (Fig. 6).

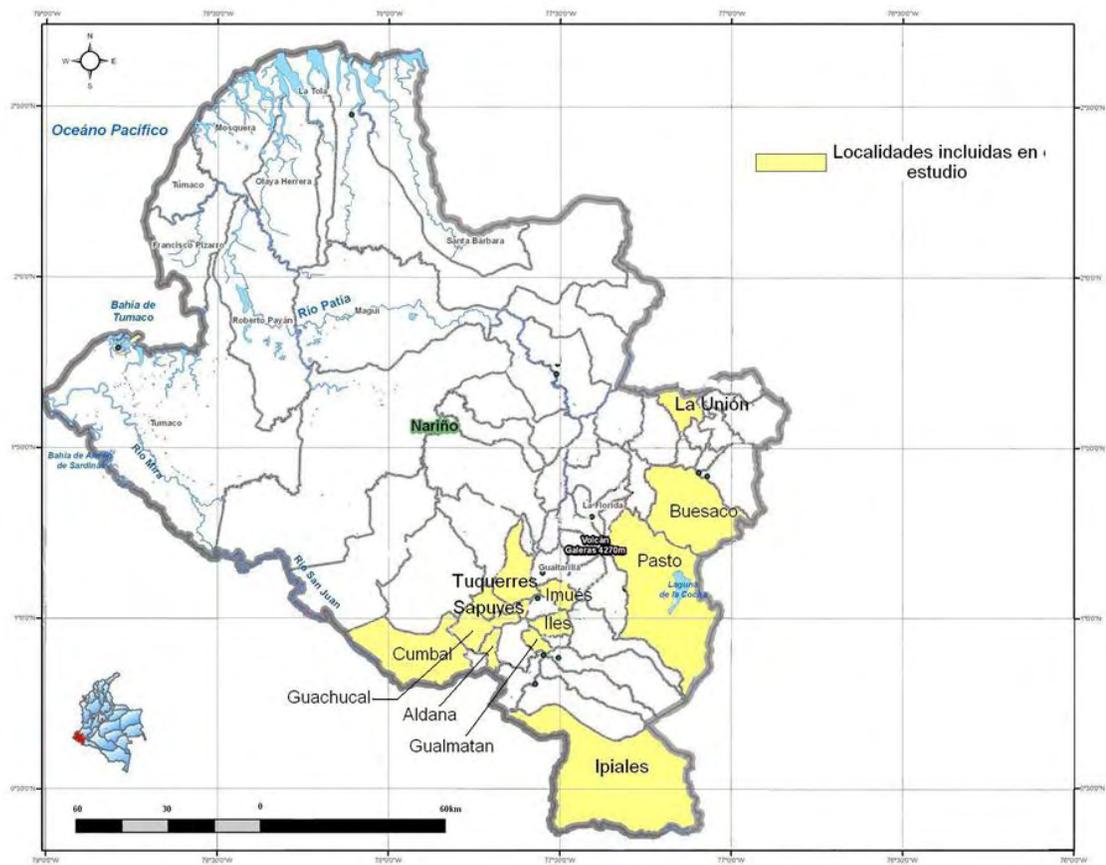


Figura 6. Localización del Departamento de Nariño (Fuente: Mideros, 2008)

6.2. MÉTODOS.

6.2.1. Aislamientos de *Phytophthora infestans*.

Los aislamientos utilizados en este estudio hacen parte de la colección de *P. infestans* a cargo del Grupo de Investigación GENPAT de la Universidad de Nariño; estos aislamientos fueron colectados durante los meses de febrero a noviembre de los años 2008 y 2009, en cultivos de *Solanum betaceum* y son mantenidos en agar tomate-arveja a 18°C. En total se utilizaron 75 aislamientos, 25 provenientes del departamento de Nariño y 50 del departamento de Putumayo (Colombia).

6.2.2. Determinación del tipo de apareamiento.

Los aislamientos empleados en este ensayo se seleccionaron a partir de la caracterización previa realizada por el grupo GENPAT (2011), donde se determinó el tipo de apareamiento de los aislamientos mediante cruces *in vitro* con un aislamiento caracterizado como A1 (2610, donado por la Universidad de los Andes) y con el uso de los primers específicos S1A y S1B, teniendo en cuenta este parámetro, se seleccionaron los aislamientos que presentaron la formación de estructuras diferentes a esporangios y no presentaron amplificación de la banda de aproximadamente 1250bp correspondiente al *locus* S1, el cual se encuentra ligado al determinante

alélico A1 del *locus* del grupo de apareamiento. Adicionalmente se consideraron los resultados obtenidos con marcadores moleculares (SSR y haplotipos) y marcadores fenotípicos (Agresividad) (Tabla 2, Anexo A); estudios previos han mostrado la asociación de la presencia de tipo de apareamiento A2 con nuevas variantes genéticas obtenidas por marcadores moleculares y con altos niveles de agresividad (Cooke *et al.*, 2012), teniendo en cuenta esta información, para esta investigación se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaron mayores niveles de agresividad y variantes genéticas particulares que potencialmente podían asociarse a la presencia del tipo de apareamiento A2.

6.2.2.1. Determinación *in vitro* del tipo de apareamiento.

La determinación *in vitro* se realizó en el laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes teniendo en cuenta la metodología propuesta por Caten & Jinks, 1968 (citado por Oliva, 2010b), cruzando 17 aislamientos de *P. infestans* sensu lato procedentes de cultivos de tomate de árbol en las zonas productoras de Nariño y Putumayo con las cepas de referencia A1 (Z32) y A2 (US 940480) proporcionadas por la PhD. Silvia Restrepo (LAMFU – Universidad de los Andes) y el PhD. William E. Fry (Cornell University) respectivamente.

Para el desarrollo de estos montajes en cada caja petri se enfrentó el aislamiento de la colección de *P. infestans* sensu lato a evaluar con dos aislamientos previamente

caracterizados con tipo de apareamiento A1 (Z32) y A2 (US-940480), adicionalmente se realizaron ensayos de auto apareamiento, cruces entre los aislamientos a evaluar y un cruce entre las cepas control. Cada ensayo se realizó por triplicado, tomando círculos de agar con micelio de 5mm de diámetro de los aislamientos caracterizados frente a un círculo de las mismas características del aislamiento a evaluar (Cepario *P. infestans* sensu lato Universidad de Nariño), estos se enfrentaron a una distancia de 3cm, los ensayos se incubaron en la oscuridad a 18°C durante aproximadamente 30 días. Los diferentes cruces se realizaron en agar centeno clarificado y agar centeno clarificado suplementado con β -sitosterol para estimular la producción de oosporas (Flier, Grunwald, Fry & Turkensteen, 2001).

6.2.2.2. Determinación Molecular del Tipo de Apareamiento Mediante el Uso de Marcadores Moleculares.

Extracción de ADN.

La extracción de ADN de los aislamientos de *P. infestans* se llevó a cabo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Nariño, empleando el protocolo de extracción directa establecido por Griffith & Shaw (1998).

Protocolo de Extracción Directa (Griffith & Shaw, 1998).

A partir de micelio seco y macerado, se agregaron 800 microlitros (μl) de buffer de extracción CTAB previamente calentado a 65 grados centígrados ($^{\circ}\text{C}$) y 1.5 μl de proteinasa K (10mg/ml, Fermentas), se incubaron las muestras durante una hora a 65 $^{\circ}\text{C}$; luego se agregaron 600 μl de cloroformo, se agito en vortex durante diez segundos, esta solución se centrifugó a 17000g durante diez minutos y se tomaron 600 μl de la fase superior, los cuales se transfirieron a un tubo nuevo y se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol; se agito cada tubo en vortex y se dejó en posición vertical a temperatura ambiente durante cinco minutos, luego se centrifugó a 17000g durante diez minutos; se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con un mililitro de etanol al 70%; los tubos se agitaron e incubaron a 65 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos antes de volver a centrifugar a 17000g durante 10 minutos; se dejaron secar los tubos en cámara de flujo hasta remover las ultimas trazas de etanol; el ADN obtenido fue resuspendido en 150 μl TE y se agregaron 5 μl de RNAsa (10 mg/ml, Fermentas), estas muestras se incubaron durante una hora, para finalmente verificar el ADN en gel de agarosa (Agarose Biotechnology Grade, AMRESCO) al 0.9% teñido con 3 μl de bromuro de etidio (1mg/ml), el cual fue visualizado en un fotodocumentador (Benchtop 3UV Transilluminators). Finalmente el ADN fue almacenado a -20 $^{\circ}\text{C}$.

La calidad del ADN se verificó mediante la integridad de las bandas y una concentración igual o superior a 25ng determinada mediante la comparación de las bandas con un ADN λ (Thermo Scientific) de 25ng.

Determinación del Tipo de Apareamiento en *P. infestans* Mediante Marcadores CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence).

Los ensayos fueron realizados en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Nariño, empleando ADN de los 17 aislamientos y de los respectivos controles para tipo de apareamiento A1 (3210) y tipo de apareamiento A2 (Pox 102) proporcionados por el Centro Internacional de la Papa - CIP Perú. Este ADN se analizó utilizando la técnica CAPS mediante una reacción control que amplifica el *locus* de apareamiento con los primers W16-1 (5'-AACACGCACAAGGCATATAAATGTA-3') y W16-2 (5'-GCGTAATGTAGCGTAACAGCTCTC-3') para distinguir ambos tipos de apareamiento en *P. infestans*. La reacción de PCR y digestión se llevó a cabo en un termociclador MyGene 96 marca Bioner, siguiendo el protocolo propuesto inicialmente por Judelson *et al.* en 1995 y reportado con algunas modificaciones por Kim & Lee (2002), Jmour & Hamada (2006), Mazáková *et al.*(2010) y Gisi *et al.* (2010) (Anexo B).

Para la visualización de los productos de PCR y digestión, se utilizó electroforesis horizontal, la cual se llevó a cabo en buffer TBE 0.5X usando gel de agarosa (Agarose Biotechnology Grade, AMRESCO) al 1.4% teñido con 3µl de bromuro de etidio (1mg/ml), el cual se corrió a 100V durante 45 minutos; las muestras se compararon con un marcador de peso molecular de 100bp (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas) y fueron visualizadas con un fotodocumentador (Benchtop 3UV Transilluminators) para ser analizadas posteriormente en Doc-it® LS Image Analysis Software versión 6.7.1.

6.2.3. Determinación de la sensibilidad a los i.a. metalaxil y cimoxanil.

Para la determinación de la sensibilidad a fungicidas se evaluaron 75 aislamientos de *P. infestans* sensu lato aislados de *Solanum betaceum* utilizando la metodología *in leaf*, con el fin de corroborar los datos obtenidos en discos de hoja se empleó la metodología en placa donde se evaluaron 20 de los 75 aislamientos, los cuales fueron seleccionados al azar, los montajes fueron realizados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño.

Para la evaluación de la sensibilidad se probaron los ingredientes activos (i.a) cimoxanil y metalaxil (Casa Comercial Syngenta); para cada ensayo se realizaron tres réplicas con el fin de obtener una estimación del error experimental y calcular una

estimación más precisa del efecto de los tratamientos, se realizaron también tres repeticiones en el tiempo, con el fin de asegurar la reproducibilidad del ensayo. Las dosis utilizadas se calcularon siguiendo una escala exponencial; de este modo, los ingredientes activos cimoxanil y metalaxil fueron disueltos en DMSO (Dimetil sulfoxido) para generar una solución stock y posteriormente las diferentes concentraciones; para el caso del i.a. cimoxanil las concentraciones utilizadas fueron 0.01, 0.1, 1, 3 y 5 µg/ml y para el i.a. metalaxil las concentraciones fueron 0.01, 0.1, 1, 2.5 y 5 µg/ml y sus respectivos testigos.

6.2.3.1. Sensibilidad de *Phytophthora infestans* a los i.a. metalaxil y cimoxanil – metodología *in leaf*

En la evaluación *in leaf* se siguió la metodología descrita por Yang, Feng, Xie & Feng (2003) y modificada por GENPAT (2011). Para los ensayos se colectaron hojas de *Solanum betaceum* cultivar híbrido, considerando que es altamente susceptible a la enfermedad (GENPAT, 2011), se cortaron discos de 3 cm de diámetro y se lavaron con agua destilada estéril y alcohol al 95%. Cada disco se sumergió durante un minuto en la solución del fungicida correspondiente y se colocaron por triplicado en cajas petri que contenían 8ml de agar bacteriológico al 1%, estas cajas fueron incubadas durante 24 horas a una temperatura de 18°C. Posterior a las 24 horas, cada

disco de hoja se inoculó en el envés con 25µL de una suspensión de 3.4×10^5 esporangios/ml.

Las cajas Petri se mantuvieron durante seis días en un cuarto oscuro a una temperatura aproximada de 18°C y humedad relativa del 60%. En el día quinto se realizó el registro fotográfico en cada tratamiento y en el día sexto, se determinó la concentración promedio de esporangios generados en cada una de las dosis evaluadas del fungicida para cada aislamiento, depositando los discos correspondientes a cada caja en un tubo con 3 ml de agua destilada, se agitó en vórtex y se tomaron 100µL de esta solución para proceder a realizar los conteos respectivos en cámara de Neubauer.

6.2.3.2. Sensibilidad de *Phytophthora infestans* a los i.a metalaxil y cimoxanil – metodología en placa.

Para la evaluación de la sensibilidad en placa se emplearon las mismas concentraciones utilizadas en la metodología *in leaf* para los dos ingredientes activos con el fin de comparar los resultados obtenidos.

Para este ensayo, se utilizó un inóculo de 5mm de diámetro, el cual se tomó de la zona de crecimiento activo de aislamientos de *P. infestans* y se ubicó en el centro de cada caja petri que contenía agar tomate - arveja previamente suplementado con la

correspondiente concentración del ingrediente activo. Una vez efectuada la inoculación, las cajas petri se sellaron herméticamente y se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 10 días, después del tercer día se registró fotográficamente el crecimiento micelial y al cabo del día decimo se realizó el conteo de esporangios, para el cual se tomó el micelio formado en cada caja petri y se depositó en un volumen de 1.5ml de agua estéril, para separar los esporangios se sometió cada tubo a vortex durante 30 segundos y se tomaron 100µl de la solución para realizar el conteo en cámara de Neubauer.

Teniendo en cuenta los valores de EC₅₀ calculados y de acuerdo a la clasificación de sensibilidad establecida por Wang *et al.* (2002), los aislamientos fueron catalogados con base a la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de sensibilidad por EC-50 (Wang *et al.*, 2002)

RANGOS		CATEGORÍA
CIMOXANIL	METALAXIL	
>10µg/mL	>10µg/mL	RESISTENTE
0.1µg/mL - 10µg/mL	0.01µg/mL - 10µg/mL	INTERMEDIO
<0.1µg/mL	<0.01µg/mL	SENSIBLE

6.2.4. Análisis Estadístico.

En cada uno de los ensayos de las metodologías *in leaf* y placa, se realizó un registro fotográfico, para la determinación del tamaño de la infección se utilizó el programa Adobe Phothoshop CS4 (Versión 11.0) y para el cálculo del área se empleó el programa ImageJ 1.45s (Waine Rasband, National Institutes of Health, USA). Con los resultados de crecimiento final se calculó el porcentaje de inhibición (Sampath *et al.*, 2007), para este caso se elaboraron tablas de contingencia y se aplicó la prueba U de Mann-Whitney con el fin de comparar los porcentajes de inhibición entre las diferentes concentraciones en el programa PAST 2.02 (Copyright Hammer y Harper, 1999-2010).

El porcentaje de inhibición se calculó con base a la siguiente formula:

$$I = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde C hace referencia al crecimiento diametral del control (cm²) y T hace referencia al crecimiento diametral en los tratamientos (cm²).

Para el cálculo de la tasa de esporulación en las dos metodologías, se expresó el número de esporangios sobre el área de crecimiento final para cada uno de los aislamientos por tratamiento; posteriormente se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para comparar los valores entre las concentraciones.

Para el establecimiento de la dosis media efectiva o EC-50 (concentración que reduce el crecimiento radial en un 50% respecto al control) de los ingredientes activos por cada aislamiento en cada una de las metodologías empleadas, se realizó un análisis Probit con los valores de inhibición y concentración obtenidos para cada uno de los aislamientos basados en un análisis de regresión lineal; con estos resultados se realizó un clúster mediante el algoritmo Euclidiano en programa PAST versión 2.02 (Copyright Hammer y Harper, 1999-2010).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Determinación del tipo de apareamiento.

7.1.1. Determinación *in vitro* del Tipo de Apareamiento.

En esta investigación no se observó la formación de oosporas en ninguno de los cruces realizados, por lo tanto no se reporta la presencia del tipo de apareamiento A2, sin embargo en todos los cruces se encontraron estructuras características de *P. infestans* (Fig. 7), lo cual corrobora la presencia del patógeno. De forma similar, estudios realizados en la región central de Colombia, reportan que el 8% de los aislamientos evaluados no formaron estructuras sexuales cuando se cruzaron con los aislamientos de referencia A2 (2768 y US940480) (Céspedes *et al.*, 2013).

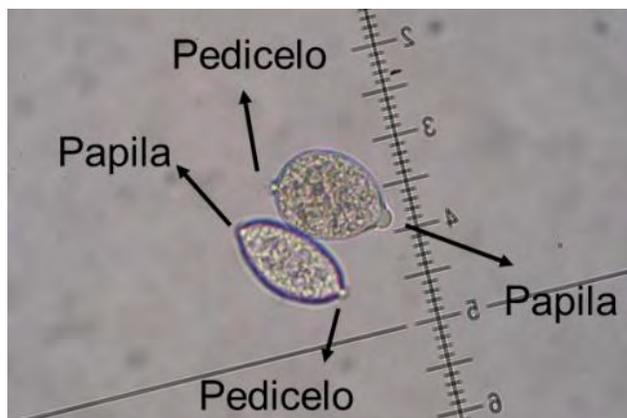


Figura 7. Esporangios de *Phytophthora infestans* encontrada en montajes de tipo de apareamiento (Aumento: 40X; Fuente: Esta investigación).

Una posible explicación para la ausencia de oosporas en los cruces, se puede relacionar con las características particulares que presentan las poblaciones evaluadas. Considerando los resultados presentados por Cárdenas *et al.* (2011), se observa que existe cierto grado de diferenciación genética entre los aislamientos de distintas zonas en el norte de la Región Andina (Colombia y Venezuela) cuando se analizan los genes *Cox1*, β -tubulina, *Ras* y *Avr3a*; para el caso particular del gen de la β -tubulina en la zona del Sur Occidente Colombiano, encontraron que se presentó el mayor número de haplotipos diferentes (9) y que cinco de ellos (H2, H3, H4, H5 y H6) estaban restringidos a esta zona (Fig. 8). Es posible que estas particularidades estén condicionando la estructura de la población y por tal razón no sea posible el

cruzamiento de *P. infestans* sensu lato procedentes de tomate de árbol con los aislamientos de referencia.

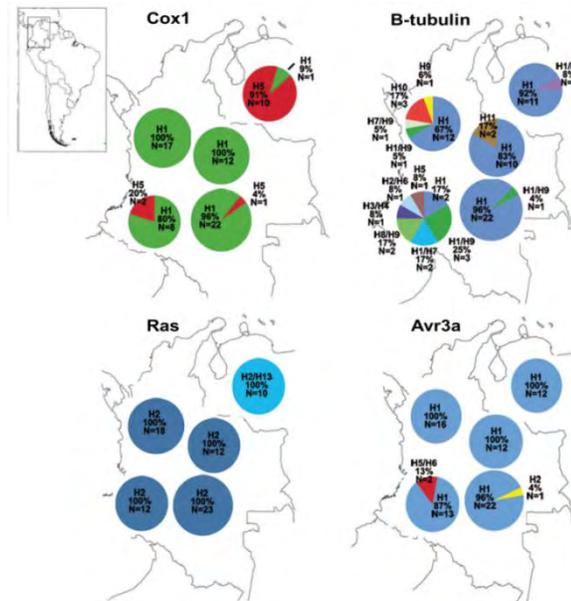


Figura 8. Distribución de haplotipos de *Phytophthora infestans* en la región norte de los Andes (Cox1, β -tubulina, Ras y Avr3a) (Fuente: Cárdenas *et al.*, 2011).

Otra posible explicación, se fundamenta en que la formación de estructuras sexuales en este patógeno, requiere que los dos tipos de apareamiento se enfrenten en el mismo medio de cultivo con condiciones experimentales específicas para la producción de oosporas. Una de las condiciones más determinantes en estos ensayos, según lo propuesto por Judelson (adaptado de Caten y Jinks, 1968) es un pH óptimo de 7.4 (Judelson, comunicación personal, 2014), el cual no fue considerado en el presente

trabajo. Sin embargo, según lo reportado por Smart y colaboradores (2000) no es posible producir oosporas en agar centeno clarificado con ninguno de los aislamientos de referencia (US940507 (A1) o US940480 (A2)) a cualquier nivel de pH.

A pesar de no reportar la presencia de los dos tipos de apareamiento en la presente investigación, la hipótesis de reproducción sexual no puede ser completamente rechazada en poblaciones de *P. infestans* aisladas de hospederos como *S. betaceum*; debido a que la ausencia del tipo de apareamiento A2 puede estar relacionada con la separación espacial de los dos tipos de compatibilidad por preferencia de hospedero, lo que hace necesario evaluar también poblaciones aisladas de otros hospederos (Cardozo de Miranda *et al.*, 2010). Además es necesario considerar que existe la posibilidad de que aislamientos del tipo A2 se encuentren en una proporción mínima dificultando su detección, como ha sido reportado en Inglaterra donde la frecuencia del tipo A2 no supera el 3% (Day *et al.*, 2004), o como en el caso de Cundinamarca (Colombia) donde se reporta que el 1% de los aislamientos presentan este tipo de apareamiento (Vargas *et al.*, 2009).

7.1.2. Determinación del Tipo de Apareamiento en *Phytophthora infestans* Mediante Marcadores CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence).

El ADN empleado en los ensayos, fue extraído mediante el protocolo descrito por Griffith y Shaw (1998), obteniendo ADN de buena calidad con concentraciones entre 30 y 100 ng, el cual presentó una sola banda sin barrido lo cual indica que éste ácido no se encontraba degradado ni con presencia de ARN, ni tampoco se observó la presencia de proteínas debido a que las muestras fueron tratadas con proteinasa K (Fermentas) (Fig. 9).

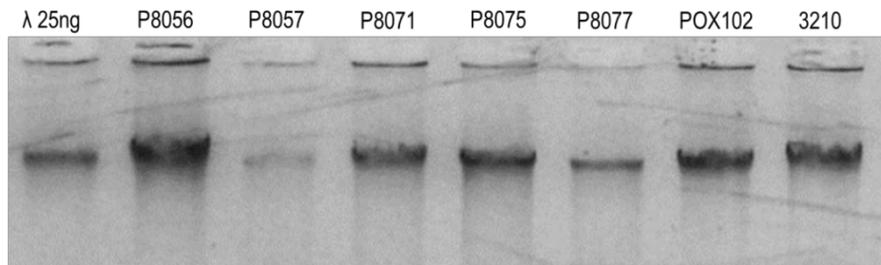
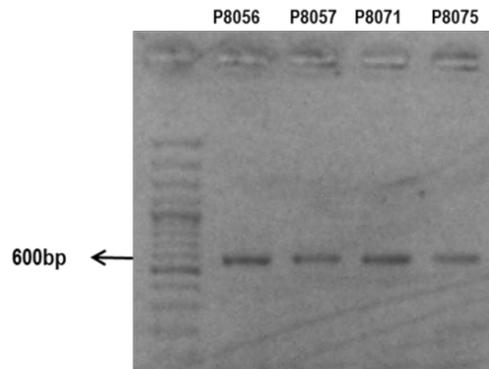


Figura 9. ADN de *P. infestans* extraído mediante el protocolo descrito por Griffith y Shaw (1998).

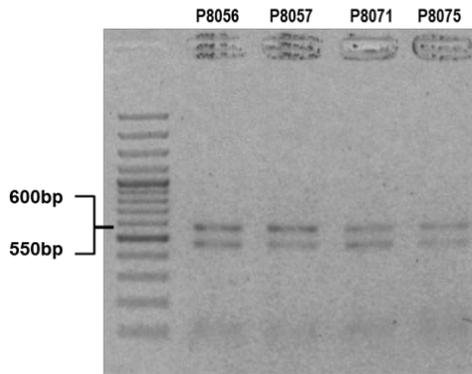
Teniendo en cuenta el protocolo propuesto por Judelson *et al.* (1995) y las modificaciones establecidas por Kim & Lee (2002), Jmour & Hamada (2006), Mazáková *et al.* (2010) y Gisi *et al.* (2010), las condiciones de amplificación y

digestión de los productos fueron optimizadas en esta investigación como se describe en el Anexo C.

Con el fin de identificar el tipo de apareamiento mediante el uso de marcadores tipo CAPS, el ADN genómico de los 17 aislamientos de *P. infestans* y los dos controles (A1 y A2) fue amplificado por PCR con los primers específicos W16-1 y W16-2, identificando un fragmento de 600 bp (Fig. 10); posteriormente el producto amplificado se digirió con la enzima de restricción *HaeIII* (Fig. 11), revelando un único patrón correspondiente al tipo de apareamiento A1, el cual presentó un estado heterocigótico exhibiendo las dos bandas esperadas de 550bp y 600bp.



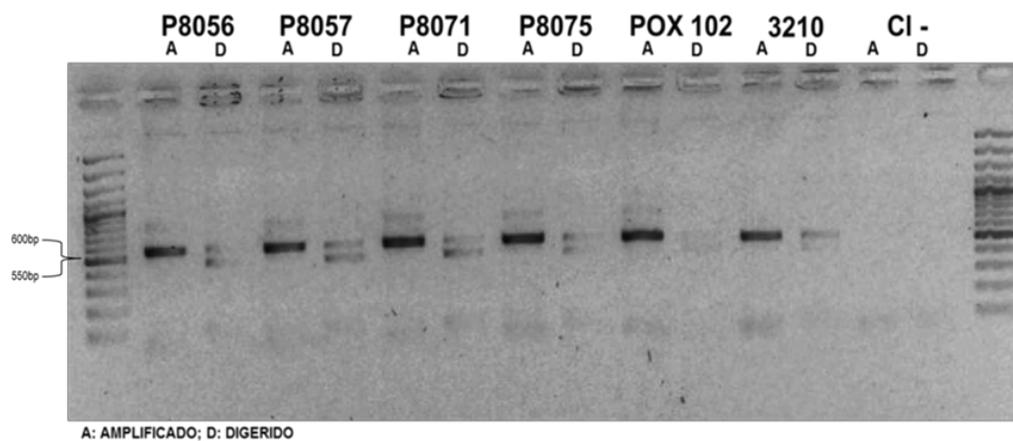
De izq. a Der.: GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas) - P8056 – P8057 – P8071 – P8075.
Figura 10. Amplificación para la determinación del tipo de apareamiento con los primers W16-1 y W16-2.



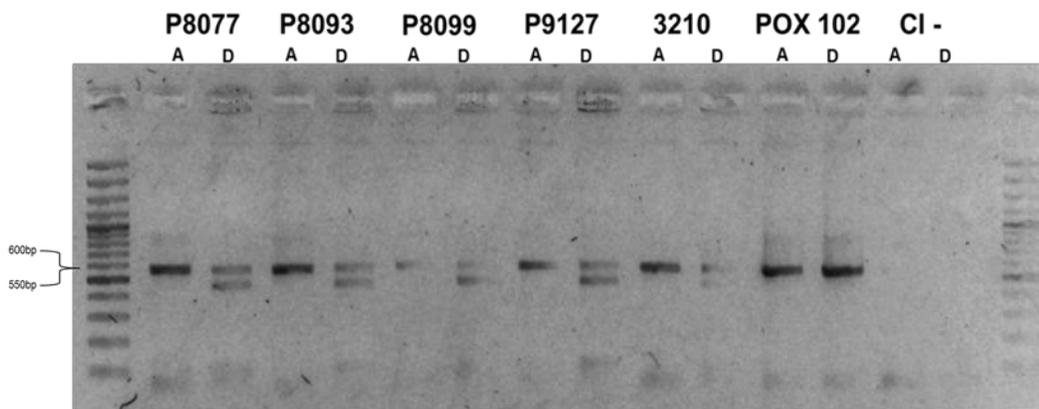
De izq. a Der.: GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas) - P8056 – P8057 – P8071 – P8075.

Figura 11. Digestión de los productos de amplificación con la enzima de restricción *HaeIII*.

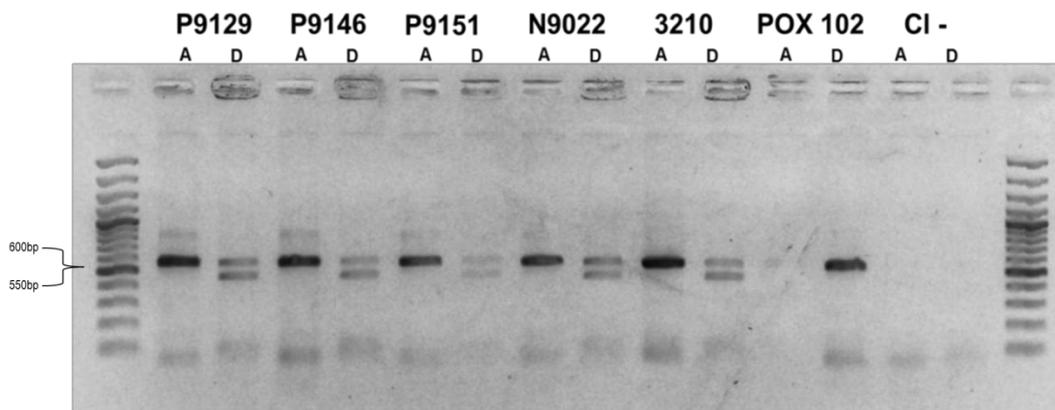
Estos polimorfismos CAPS permitieron diferenciar con precisión la presencia de un solo tipo de apareamiento en los 17 aislamientos evaluados, estos resultados indican que las poblaciones del patógeno que afectan los cultivos de tomate de árbol en el Sur Occidente Colombiano, corresponden solo al tipo de apareamiento A1 (Fig. 12), es decir que presumiblemente la reproducción del patógeno es de tipo asexual.



A: AMPLIFICADO; D: DIGERIDO



A: AMPLIFICADO; D: DIGERIDO



A: AMPLIFICADO; D: DIGERIDO

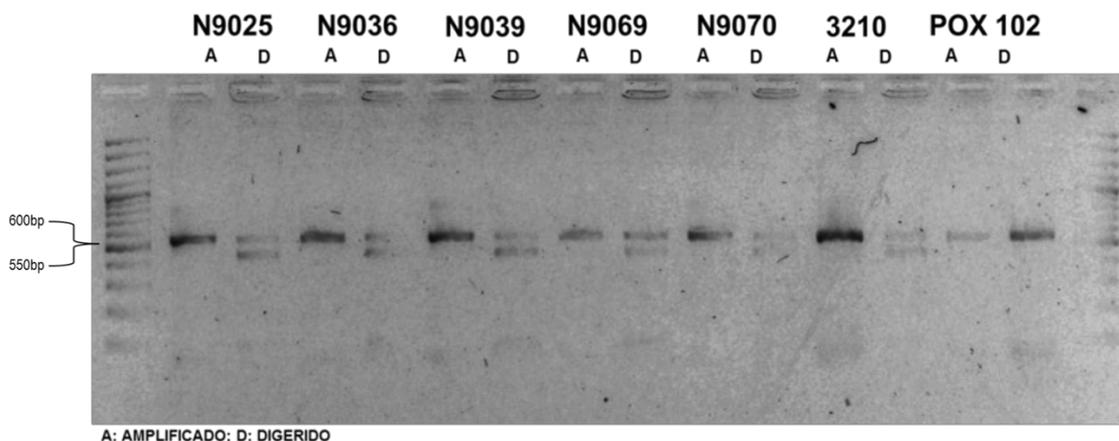


Figura 12. Fragmentos amplificados por PCR a partir de ADN de 17 aislamientos de la colección de la Universidad de Nariño y dos aislamientos control (A1 y A2) de *Phytophthora infestans* utilizando los primers W16-1 y W16-2 (A) y restricción de la digestión usando la enzima HaeIII (D) (POX 102: aislamiento de referencia A2; 3210: aislamiento de referencia A1; Cl-: agua; GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas).

Actualmente se desconoce la causa por la cual el tipo de apareamiento A2 en poblaciones de *P. infestans* aisladas de tomate de árbol no ha sido reportada, una posible explicación es que se encuentra asociado a otras solanáceas como *S. brevifolium* y *S. muricatum* como ocurre en Ecuador (Adler *et al.*, 2004), o como el caso de Colombia, en donde el monitoreo en poblaciones colectadas de papa y otros hospederos hasta el año 2004 solamente habían detectado la presencia del tipo de apareamiento A1 (Carreño *et al.*, 2007), no obstante, en el año 2008 se reporta por

primera vez la presencia del tipo de apareamiento A2 en *Physalis peruviana* para la región central del país (Vargas *et al.*, 2009).

En el resto de Colombia no se conocen reportes de poblaciones donde coexistan ambos tipos de apareamiento, por tal razón, es evidente el predominio de reproducción asexual y por consiguiente una condición clonal de las poblaciones evaluadas. Sin embargo, si bien la presencia del tipo de apareamiento A2 en lugares donde antes no existía ha sido la mayor evidencia de cambios poblacionales, las poblaciones con tipo de apareamiento A1 tienen también la capacidad de cambiar rápidamente, hasta el punto de aumentar su patogenicidad y resistencia a los fungicidas (Fry & Goodwin, 1997; Páez *et al.*, 2004). Probablemente esta condición se relacione con la migración de *P. infestans*, ya que este fenómeno es el que mejor ha explicado la aparición de nuevos genotipos y el incremento en la variación genética de las poblaciones (Dorrance *et al.*, 1999), es así como eventualmente el tipo de apareamiento A2 pudo haber llegado al país desde otras latitudes, pero por las condiciones ambientales y de manejo no se ha adaptado de manera exitosa (Silva *et al.*, 2009).

Adicionalmente, la presencia de polimorfismos en las poblaciones (GENPAT, 2011) y las variaciones en cuanto a sensibilidad al i.a. cimoxanil reportadas en esta investigación, se atribuyen a fuentes de variabilidad diferentes a la recombinación

sexual, que pueden ser explicadas a partir de mecanismos genéticos como parasexualidad o recombinación mitótica, mutaciones espontaneas (Abu-El *et al.*, 2003; Mesa *et al.*, 2008), cruces intra-específicos, autofertilización o autocruzamiento (Oliva, 2009) o presencia de elementos extracromosomales (Goodwin, 1997; Mascheretti *et al.*, 2008; Goss *et al.*, 2009), las cuales en organismos heterocigotos, generan mayor variabilidad y se constituyen como un factor importante en la epidemiología del patosistema (Smart *et al.*, 2000).

En conclusión, la ausencia del tipo de apareamiento A2 del patógeno *P. infestans* en las poblaciones de Nariño y Putumayo, impide eventos de reproducción sexual entre los aislamientos, reduciendo la probabilidad de generación de variantes recombinantes que tendrían ventajas agroecológicas como la capacidad de superar genes de resistencia en los hospederos, la pérdida de sensibilidad a los fungicidas empleados para el control y la mejor adaptación a las condiciones medioambientales (Spielman *et al.*, 1991; Fry & Goodwin, 1995 citado en Silva *et al.*, 2009).

7.2. Determinación de la sensibilidad a los i.a. metalaxil y cimoxanil.

En esta investigación se evaluó la sensibilidad *in vitro* y en placa de aislamientos de *P. infestans* *sensu lato* obtenidos de *Solanum betaceum* procedentes de los

departamentos de Putumayo y Nariño a los ingredientes activos metalaxil y cimoxanil. Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron determinar que existen diferencias en el comportamiento del patógeno frente a las concentraciones de los dos ingredientes activos, presentándose una relación inversa entre la concentración y área de crecimiento, así como también entre la concentración y las tasas de esporulación en la mayoría de los tratamientos.

7.2.1. Ingrediente Activo Metalaxil.

En la presente investigación se comprobó la alta efectividad de la molécula Metalaxil sobre la inhibición en el crecimiento del patógeno *P. infestans* (Fig. 13). Con el registro de crecimiento diario de cada uno de los aislamientos fue posible establecer el porcentaje de inhibición en cada una de las concentraciones, encontrando que el 100% de los aislamientos inhibieron su crecimiento desde la primera dosis evaluada 0.01 µg/ml en las dos metodologías empleadas (Fig. 14).

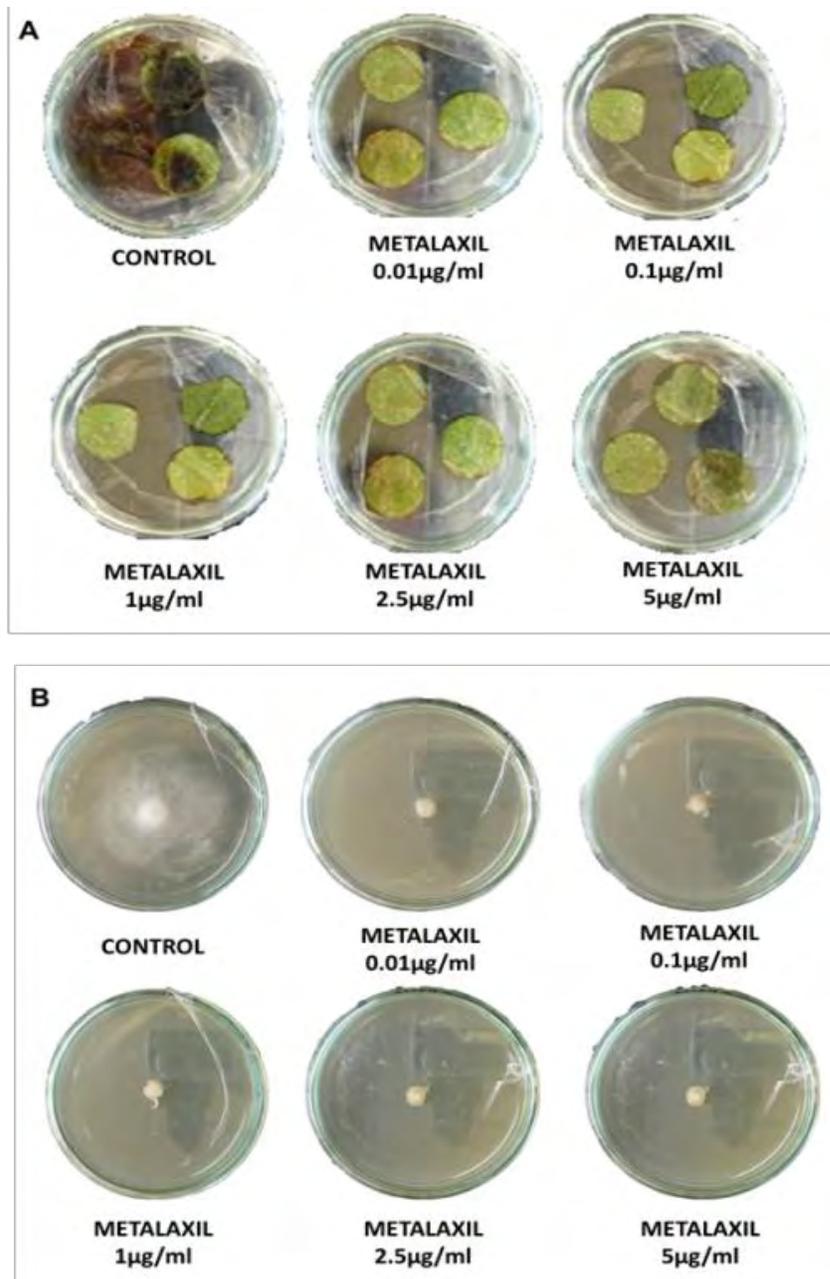


Figura 13. Crecimiento del aislamiento P9102 en diferentes concentraciones del ingrediente activo Metalaxil (A. Metodología *in leaf*. B. metodología en placa. Fuente: Esta investigación)

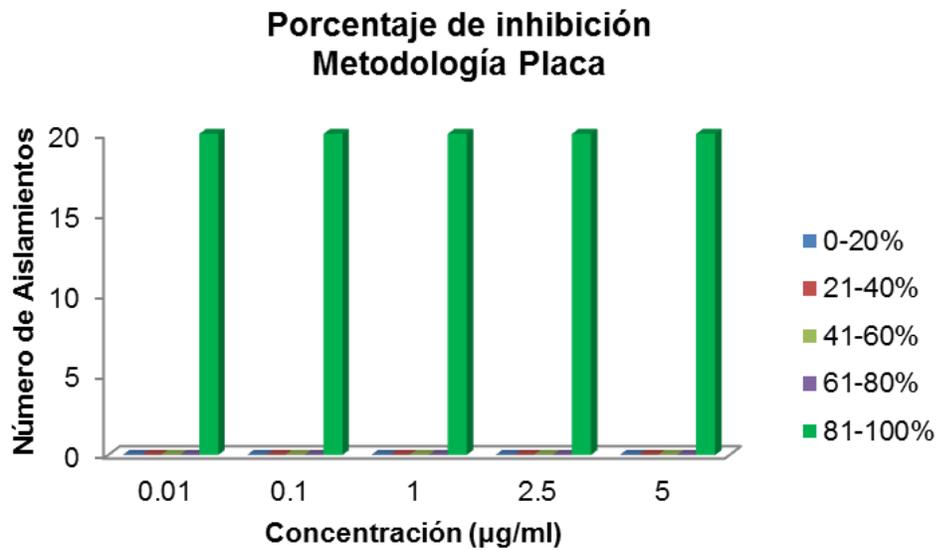
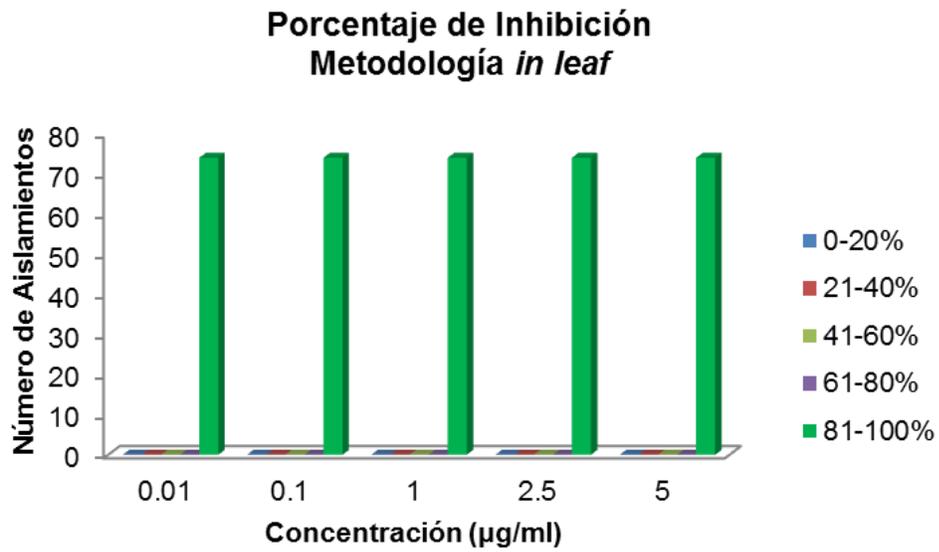


Figura 14. Distribución de la frecuencia de porcentaje de inhibición en aislamientos de *P. infestans* en las diferentes concentraciones del ingrediente activo Metalaxil.

Teniendo en cuenta que los datos no presentaban homogeneidad en las varianzas, se utilizó la prueba de Kruskal-wallis con el fin de determinar si existían diferencias en el efecto de las concentraciones sobre el porcentaje de inhibición, los resultados obtenidos muestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre el control y las diferentes concentraciones con un p-valor ≤ 0.05 para las dos metodologías, sin embargo la comparación entre las diferentes concentraciones muestra que no hay diferencias (Tabla 4, Anexo D; Tabla 5, Anexo E).

Teniendo en cuenta que metalaxil afecta la síntesis de RNA ribosomal, y por ende la síntesis de las proteínas y la reducción del crecimiento del micelio (Nuninger *et al.*, 1995 citado en Jaramillo, 2003; Fernández-Northcote *et al.*, 1999; Grünwald *et al.*, 2006), todas las concentraciones del ingrediente activo evaluadas en esta investigación presentaron un evidente efecto de inhibición sobre el crecimiento del patógeno.

Con relación a la tasa de esporulación, se encontró reducción del 100% a partir de la primera concentración evaluada (0.01 μ g/ml), al igual que los resultados presentados para porcentaje de inhibición. El análisis estadístico de Kruskal-wallis para la metodología *in leaf* indica que no existen diferencias significativas entre el testigo absoluto y las diferentes concentraciones con un p-valor de 0.1248; en el caso de la metodología en placa se observó que existen diferencias significativas entre las tasas

de esporulación del control y las concentraciones (p-valor: 1.02E-06), sin embargo entre las diferentes concentraciones no se presentan diferencias en las tasas de esporulación (p-valor: 1) (Tabla 6, Anexo F; Tabla 7, Anexo G).

El hecho de no encontrar diferencias en las tasas de esporulación para la metodología *in leaf* se debe quizás a que algunos aislamientos de *P. infestans* no tienen la capacidad de esporular en los discos de hoja control, esta situación se debe quizás a que existen factores que afectan a la producción y el desarrollo de los esporangios como son la humedad, la tensión de oxígeno, la luz, la temperatura y la nutrición, sin embargo el micelio es capaz de vivir de forma saprófita sobre materia orgánica asegurando la invasión del tejido vegetal por parte del patógeno (Erwin & Ribeiro, 1996). En el caso de los aislamientos tratados con metalaxil, no se observó esporulación, debido posiblemente a que este compuesto es altamente sistémico, inhibiendo la esporulación y el desarrollo de esporangios del patógeno (Goodwin *et al.*, 1996; Egan *et al.*, 1995). En el caso de los ensayos en agar, se evidenció alta tasa de esporulación en el tratamiento control (130573.88 esporangios/cm²) (Tabla 8 Anexo H), sin embargo en la primera dosis evaluada este promedio se redujo en un 100% evidenciando una alta efectividad antiesporulante por parte del ingrediente activo.

A partir de los resultados de inhibición se obtuvo el valor de la dosis media efectiva (EC-50), para el caso del ingrediente activo metalaxil se encontró que todos los

valores de EC-50 fueron inferiores a 0.01µg/ml y teniendo en cuenta este comportamiento, todos los aislamientos fueron catalogados como sensibles según la escala establecida por Wang y colaboradores (2002).

Sobre la base de las clases de resistencia, se puede determinar que las poblaciones de Nariño y Putumayo son altamente sensibles al ingrediente activo metalaxil; en contraste, estudios realizados en Latinoamérica, han reportado la presencia de una gama de niveles de respuesta (resistente, intermedio, sensible) al ingrediente activo en aislamientos de diferentes hospederos de solanáceas como es el caso de Ecuador (Forbes *et al.*, 1997; Adler *et al.*, 2004), Costa Rica (Páez *et al.*, 2001), México (Grünwald *et al.*, 2006) y Brasil (Reis *et al.*, 2005; Cardozo de Miranda *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2013), sin embargo es posible encontrar también poblaciones altamente resistentes como en el caso de Chile y Perú (Riveros *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2009).

Algunas posibles explicaciones a la ausencia de poblaciones del patógeno resistentes o medianamente resistentes a metalaxil, son quizás los cambios que ha presentado el ingrediente activo, ya que desde el año 2002 se ha distribuido en el mercado una molécula dos veces más efectiva que el metalaxil genérico conocida como metalaxil-m (contiene el enantiómero-R); otra situación, es que posiblemente esta molécula ya no se utiliza con tanta frecuencia para el control del tizón tardío en las zonas

productoras de tomate de árbol en el Sur Occidente Colombiano, debido a una sustitución gradual del producto comercial por nuevas mezclas que contienen fungicidas de tipo preventivo y curativo como cimoxanil, dimetomorf, propamocarb o estrobilurinas (Cardozo de Miranda *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2013). Otra de las razones es la ausencia de un cultivo intensivo y continuo, así como también la rotación constante del cultivo de *S. betaceum* en las zonas productoras.

En la presente investigación no fue posible obtener información relacionada con las pautas de control químico históricamente empleadas en el manejo de la enfermedad para ninguna de las localidades en los dos departamentos; esta situación no permite analizar los patrones de tendencia de sensibilidad en función de la localidad o manejo del patógeno, sin embargo, Alpala (comunicación personal, 2014) reporta que en los años 2008 y 2009 se utilizaba con más frecuencia los ingredientes activos cimoxanil y mancozeb, y quizás por esta razón se observó un comportamiento homogéneo en cuanto a la respuesta sensible del patógeno a metalaxil; adicionalmente, según lo reportado por Fry y colaboradores (1993), los niveles de resistencia a metalaxil son mayores en poblaciones de *P. infestans* procedentes de campos de producción en los cuales se utiliza con más frecuencia este fungicida, que en las poblaciones procedentes de huertas o pequeños cultivos en donde el fungicida es raramente utilizado (Adler *et al.*, 2004).

Según el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas (Brent & Hollomon, 2007), la insensibilidad de *P. infestans* a los compuestos del grupo de las fenilamidas se asocia con el uso en solitario de metalaxil (Goodwin *et al.*, 1992 citado en Páez *et al.*, 2001); sin embargo en países donde se aplican mezclas con mancozeb es posible que el fenómeno de resistencia no se haya presentado, por esta razón la FRAC (2006) recomienda el uso de mezclas de tanque o mezclas comerciales que incluyan fungicidas del tipo fenilamidas con productos protectantes multisitio. Tanto en el departamento de Nariño como en Putumayo, los altos niveles de sensibilidad de los aislamientos se atribuyen a la aplicación de la molécula que se distribuye comercialmente como Ridomil® Gold MZ 68 WP (metalaxyl-M 4% y mancozeb 64%) al cual las poblaciones de *P. infestans* procedentes de tomate de árbol no ha generado resistencia.

Teniendo en cuenta los valores de EC-50 se realizó un clúster mediante el algoritmo Euclidiano para determinar la variación entre aislamientos de acuerdo a su respuesta al ingrediente activo. En este caso todos los aislamientos de *P. infestans* obtenidos de *S. betaceum* en Nariño y Putumayo formaron un solo grupo en las dos metodologías empleadas (Fig. 15 y 16), encontrando el 100% de los aislamientos inhibieron su crecimiento y sus tasas de esporulación a partir de la concentración de 0.01 µg/ml y siendo catalogados como sensibles.

Estos resultados permitieron establecer que no hay diferencias con respecto a la procedencia de los aislamientos y que existe homogeneidad en la población, presentándose poca variabilidad en la respuesta de los aislamientos al ingrediente activo metalaxil, esta situación sugiere que en este caso la sensibilidad al i.a. metalaxil no fue un buen marcador para evidenciar la diversidad genética reportada por otros marcadores tanto fenotípicos como genotípicos.

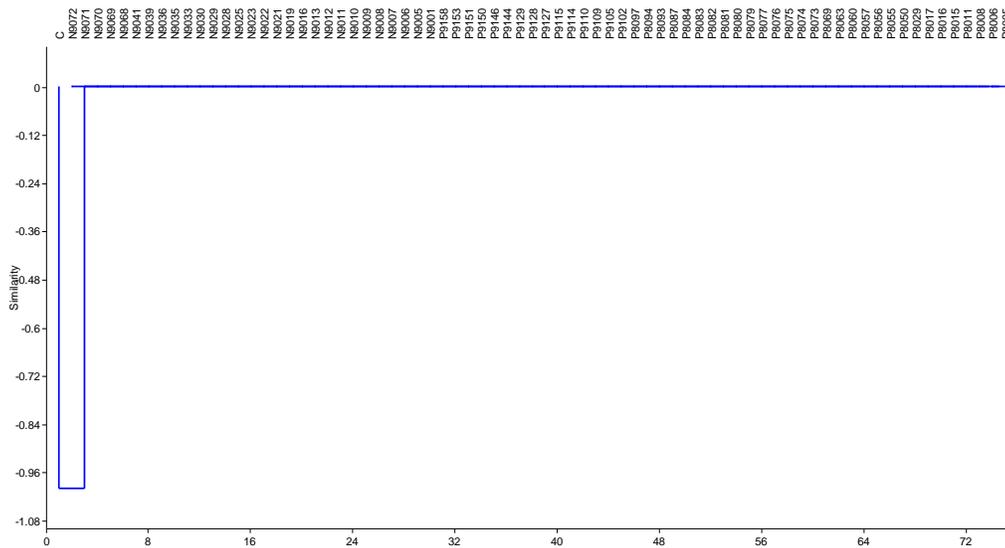


Figura 15. Agrupamiento de aislamientos de *Phytophthora infestans* de Nariño y Putumayo con base en la EC-50 de Metalaxil (Metodología *in leaf*)

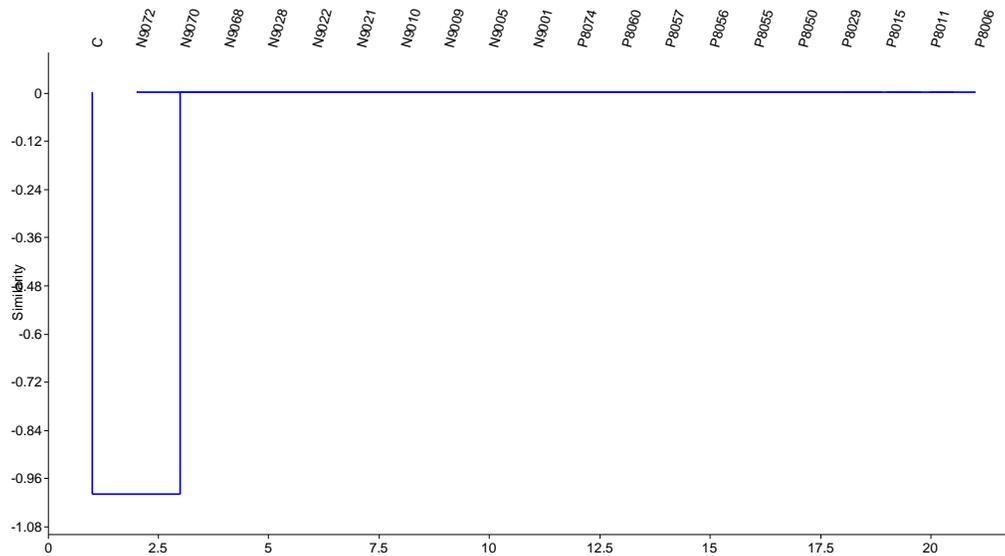


Figura 16. Agrupamiento de aislamientos de *Phytophthora infestans* de Nariño y Putumayo con base en la EC-50 de Metalaxil (Metodología en placa).

7.2.2. Ingrediente Activo Cimoxanil.

En la presente investigación se reporta la presencia de poblaciones resistentes del oomycete al ingrediente activo cimoxanil, encontrando que para las dos metodologías empleadas el 8% de los aislamientos presentaron crecimiento hasta la concentración de 0.1 µg/ml (Fig. 17).

En cuanto a los porcentajes de inhibición se observó que para la metodología *in leaf* existen diferencias estadísticamente significativas con un p-valor <0.05 entre el control y la primera concentración evaluada ($0.01 \mu\text{g/ml}$), y entre esta última y el resto de las concentraciones, sin embargo entre 0.1 , 1 , 3 y $5 \mu\text{g/ml}$ no se presentaron diferencias significativas (p-valor: 1) en la inhibición del crecimiento del patógeno. En el caso de la metodología en placa se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre el testigo absoluto y las diferentes dosis (p-valor: <0.05), sin embargo entre las concentraciones evaluadas no se presentan diferencias (p-valor: 1) (Tabla 9, Anexo I; Tabla10 Anexo J).

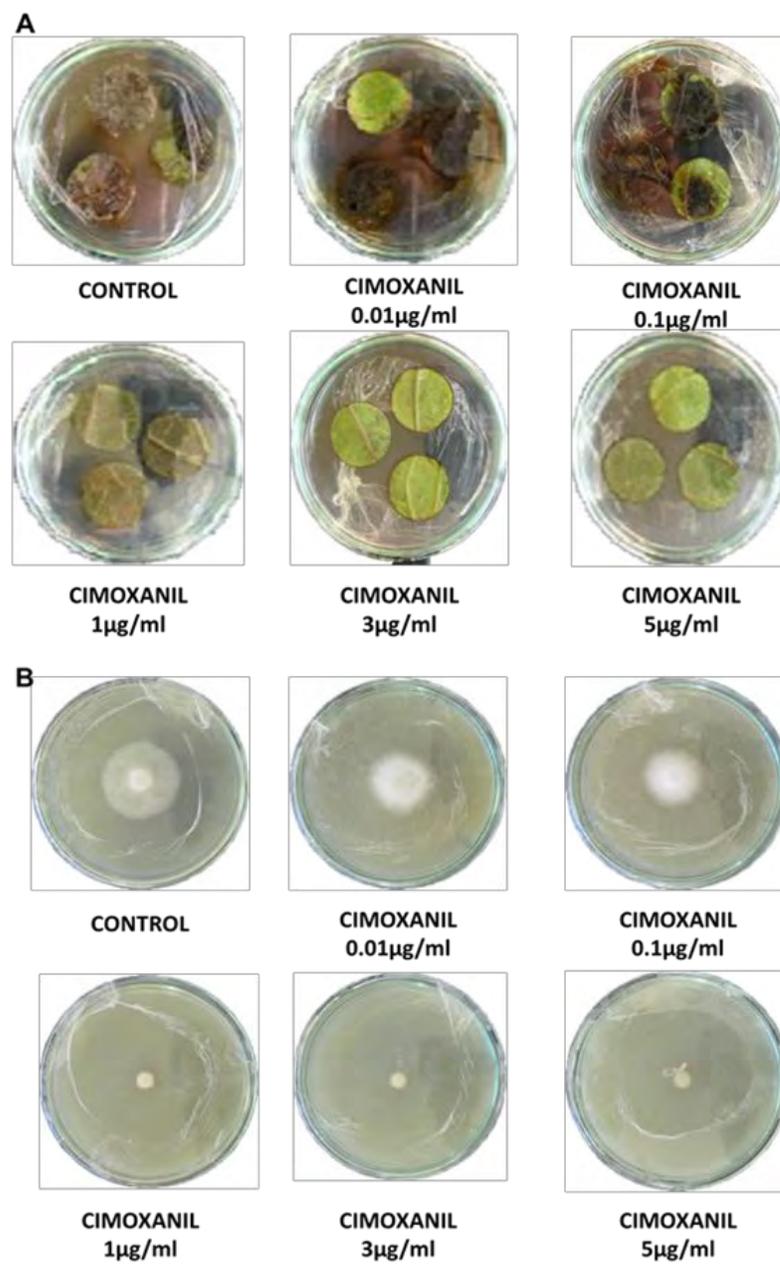


Figura 17. Crecimiento del aislamiento N9025 en diferentes concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil (A. Metodología *in leaf*. B. metodología en placa. Fuente: Esta investigación)

En este estudio se evidencia la efectividad del ingrediente activo cimoxanil frente al crecimiento y tasa de esporulación del patógeno *P. infestans*. Para la metodología *in leaf* se observó que el 57% de los 74 aislamientos evaluados presentaron inhibición entre el 81 y 100% para la primera dosis, en el caso de las demás concentraciones entre el 89 y el 100% de los aislamientos presentaron el mismo comportamiento (Fig. 18); cabe señalar que los aislamientos P9105 y P9127 son los únicos que presentaron crecimiento hasta la concentración de 1µg/ml, pero su crecimiento se inhibió completamente en la concentración de 3µg/ml. En la metodología en placa se observó un comportamiento diferente debido a que desde la primera dosis evaluada, entre el 95 y el 100% de los aislamientos inhibieron su crecimiento en un rango entre el 81 y 100% (Fig. 19).

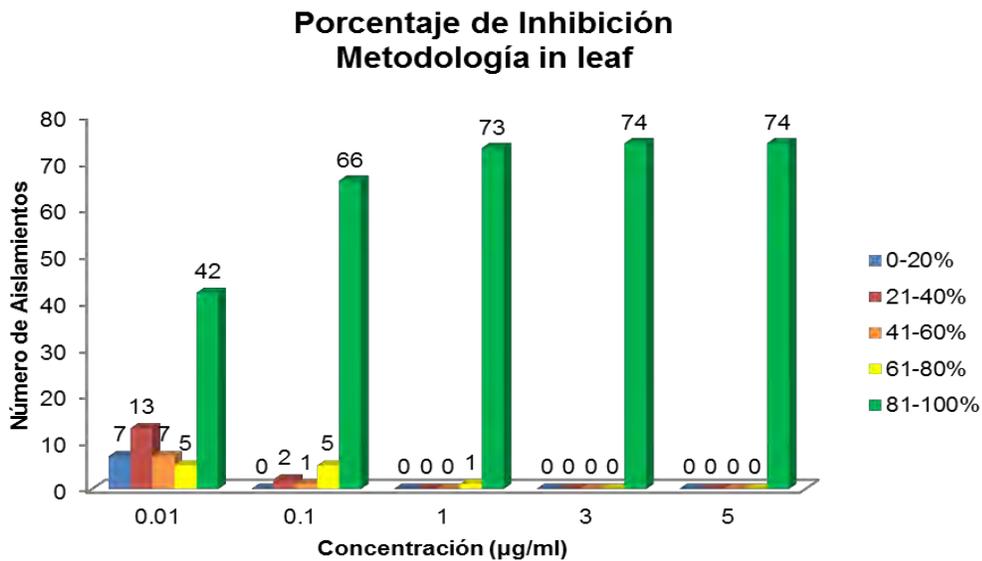


Figura 18. Distribución de la frecuencia de porcentaje de inhibición en aislamientos de *Phytophthora infestans* en las diferentes concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil (metodología *in leaf*).

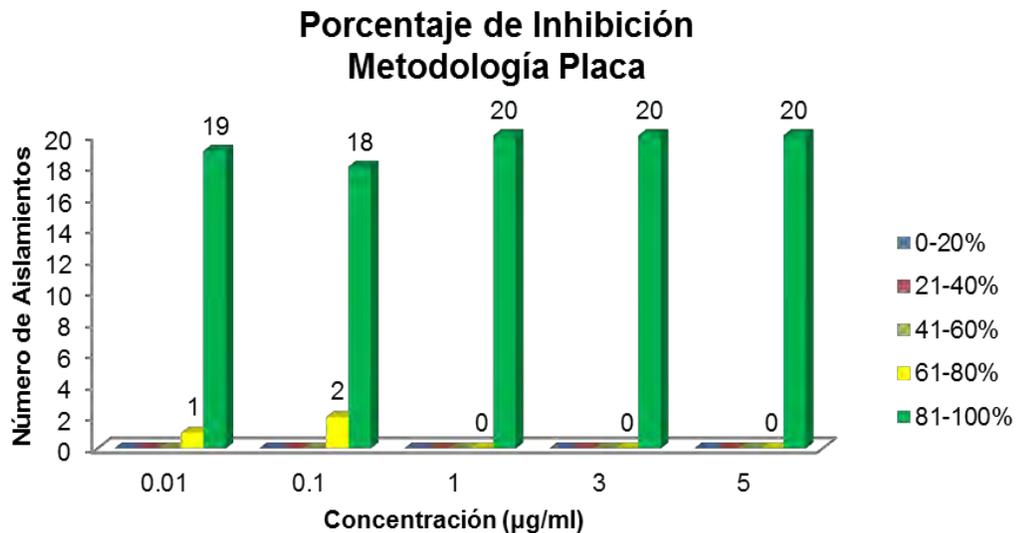


Figura 19. Distribución de la frecuencia de porcentaje de inhibición en aislamientos de *Phytophthora infestans* en las diferentes concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil (metodología en placa).

La eficiencia en la inhibición del crecimiento del patógeno, se debe probablemente a que este ingrediente activo afecta su metabolismo, principalmente inhibiendo la síntesis de ARN, alterando la germinación de las zoosporas en la superficie de las hojas y principalmente destruyendo el micelio del oomycete durante el periodo de incubación, lo cual no permite que se originen nuevas lesiones en la planta (Helm de México S.A., s.f.).

Con respecto a las tasas de esporulación no se encontró relación entre la concentración y la cantidad de esporangios cuantificados en cada uno de los tratamientos, observando que el 82% de los aislamientos no presentaron esporulación en el tratamiento control y el 96% no presentaron esporulación en las concentraciones evaluadas en la metodología *in leaf*, en este caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de esporulación en las diferentes dosis evaluadas con un p-valor de 0.3379 (Tabla 11 Anexo K).

En cuanto a la metodología en placa, el análisis estadístico de Kruskal- wallis mostró que existen diferencias significativas entre las tasas de esporulación del testigo absoluto y las diferentes concentraciones evaluadas (p-valor <0.05) (Tabla 12 Anexo L), sin embargo, en el tratamiento control se observó una alta capacidad de esporulación (tasa de esporulación promedio de 143723.9 esporangios/cm²) (Tabla 13 Anexo M). En la primera dosis evaluada este promedio se redujo en un 90% evidenciando una alta efectividad antiesporulante por parte del ingrediente activo.

Este fenómeno se presentó quizás por la alta capacidad antiesporulante del ingrediente activo cimoxanil, ya que según lo reportado por Ziogas y Davidse (1987) a concentraciones por debajo de 1µg/ml, esta molécula es eficaz en la inhibición de la producción de zoosporas y del crecimiento micelial, el enquistamiento de las zoosporas y la formación del tubo germinal, además se considera que limita la

formación de esporangios al reducir su poder germinativo (Keinath, 2007; Helm de México S.A.).

Respecto a los valores de EC-50, los resultados de la presente investigación indican que existe un amplio espectro de sensibilidad/resistencia a cimoxanil en las poblaciones de *P. infestans* de los departamentos de Nariño y Putumayo. Teniendo en cuenta la escala establecida por la Wang *et al.* (2002), el 8% de la población evaluada fue catalogada como resistente con valores extremos de EC-50 entre 12.7 y 150.8 $\mu\text{g/ml}$, el 14% como intermedio con valores que se encontraban en un rango entre 0.65 y 9.51 $\mu\text{g/ml}$, y el 78% sensibles con un EC-50 promedio de 0.012 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 20).

Sensibilidad de *P. infestans* al i.a. Cimoxanil

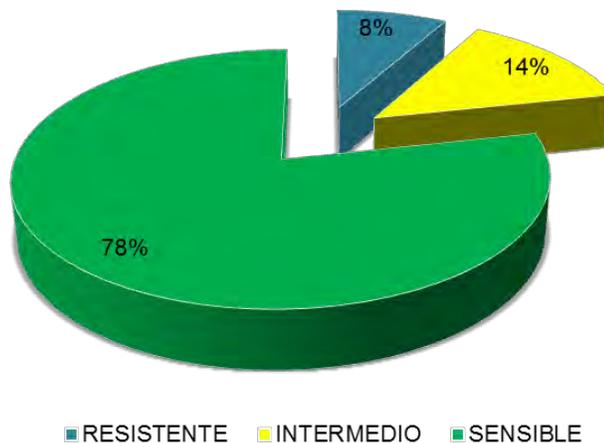


Figura 20. Sensibilidad de los aislamientos de *P. infestans* al ingrediente activo Cimoxanil (metodología *in leaf*).

Cuando se comparan los resultados de sensibilidad de la población evaluada con otros estudios realizados en el país, es posible encontrar poblaciones con porcentajes elevados de aislamientos sensibles a cimoxanil; de este modo, Lagos (2002) encontró que el 83% de aislamientos de *P. infestans* provenientes de cultivos de papa en Nariño, resultaron ser sensibles al i.a. cimoxanil; del mismo modo, Ochoa (2004) encontró que al evaluar la sensibilidad de 50 aislamientos de *P. infestans* obtenidos en diferentes regiones de Colombia, ninguno de ellos tuvo la capacidad de crecer en medios de cultivo cuando se adicionó a éste una concentración de 0,8 mg/L del i.a. cimoxanil, estos resultados demuestran que en las poblaciones evaluadas no se reportó ningún aislamiento con resistencia a la molécula.

La ausencia de aislamientos resistentes también ha sido reportada en Latinoamérica; de este modo, en 2005 Reis y colaboradores reportaron que para cimoxanil, los 47 aislamientos evaluados presentaron valores de EC-50 por debajo de 1 µg/ml, determinando que para la población estudiada en Brasil no existen pruebas de la resistencia de *P. infestans* al fungicida comercial que contiene esta molécula. Del mismo modo en Huánuco (Perú), Perez y colaboradores (2009) reportan la ausencia de aislamientos resistentes a cimoxanil en las poblaciones del patógeno aislado de cultivos de papa, en donde el ingrediente activo inhibió el crecimiento del patógeno desde concentraciones de 0,01µg/ml y presentaron valores EC-50 promedio de

0.6µg/ml, concluyendo que todos los aislamientos fueron más sensibles al i.a. cimoxanil que al i.a. metalaxil.

En cuanto a evaluaciones con el producto comercial (investigación en curso grupo Genpat), realizó la evaluación de sensibilidad de siete aislamientos de *P. infestans* provenientes de cultivos de tomate de árbol en el departamento de Putumayo al producto comercial Curzate® M-8 (Cimoxanil 8% y Mancozeb 64%), encontrando que el 57% de los aislamientos fueron catalogados como intermedios y el 43% como resistentes. En contraste a estos resultados, estudios realizados por García y colaboradores (2008) en cuanto a sensibilidad de poblaciones de *P. infestans* aisladas de *Solanum tuberosum* en Antioquia, Cundinamarca y Boyacá a Curzate® M-8, indicaron que la población estudiada presenta altos niveles de sensibilidad al fungicida con valores promedio EC-50 de 0,28 mg/L.

La presencia de aislamientos resistentes en la población evaluada puede ser explicada teniendo en cuenta lo propuesto por Grünwald y colaboradores (2006), quienes plantean que existe una selección direccional para la resistencia a cimoxanil, producto de repetidas aplicaciones del compuesto en el cultivo; adicionalmente Gisi *et al.* (2000) sugieren también que esta situación se debe probablemente a errores de manejo como el uso de subdosis y sobredosis del fungicida, así como la insuficiencia

en la cobertura de la planta, dichas condiciones pueden ejercer una mayor presión e inducir a una selección de poblaciones insensibles del patógeno.

En esta investigación no fue posible recopilar información acerca de las pautas de control químico empleado para el tizón tardío, por esta razón no es posible afirmar que los datos obtenidos estén asociados al inadecuado control que se lleva a cabo en las zonas productoras, sin embargo, según Alpala (comunicación personal, 2014) durante los años 2008 y 2009, el ingrediente activo cimoxanil fue el más comercializado para la fumigación de cultivos de tomate de árbol en Nariño y Putumayo.

El presente reporte alerta sobre la posibilidad de encontrar poblaciones de *P. infestans* altamente resistentes al i.a. cimoxanil, un indicio de ello es la presencia de un aislamiento con un valor de EC-50 hasta dieciocho veces superior (150.82µg/ml) a la media encontrada en el resto de la población (8.8µg/ml), esta situación se convierte en un indicativo de la necesidad de implementar medidas de prevención como la reducción del uso de productos comerciales que contengan el ingrediente activo evaluado, así como también la rotación con otros fungicidas sistémicos que presentan diferentes modos de acción, con el fin de evitar la aparición de aislamientos con resistencia a esta molécula (Gullino *et al.*, 1997 citado en García *et al.*, 2008).

A partir de los resultados obtenidos en la metodología *in leaf*, en cuanto a la categorización de la población teniendo en cuenta los valores de EC-50 (Tabla 14, Anexo N), se realizó un análisis que permitió agrupar los aislamientos de *P. infestans* de acuerdo a su respuesta al ingrediente activo cimoxanil, este análisis de agrupamiento (Fig. 21) permitió establecer la formación de tres grupos, en el primero se ubican 58 aislamientos catalogados como sensibles a la molécula con valores de EC-50 en un rango entre 0 y 0.099 μ g/ml; el segundo grupo lo conforman seis aislamientos catalogados como resistentes con valores EC-50 de 12.72 a 150.81 μ g/ml y finalmente el último grupo conformado por diez aislamientos catalogados como intermedios con valores de EC-50 que varían entre 0.65 y 9.51 μ g/ml; este comportamiento frente al ingrediente activo evaluado, permitió establecer que para las poblaciones de *P. infestans* cimoxanil es un buen marcador fenotípico, a pesar de presentar una condición clonal, ya que se observaron diferencias en cuanto a crecimiento y esporulación por efecto de la molécula.

En el análisis de agrupamiento en base a los datos obtenidos en la metodología en placa se observa la formación de un solo grupo (Fig. 22), en donde todos los aislamientos fueron catalogados como sensibles al ingrediente activo cimoxanil, presentando valores de dosis medias en un rango entre 0 y 0.028 μ g/m

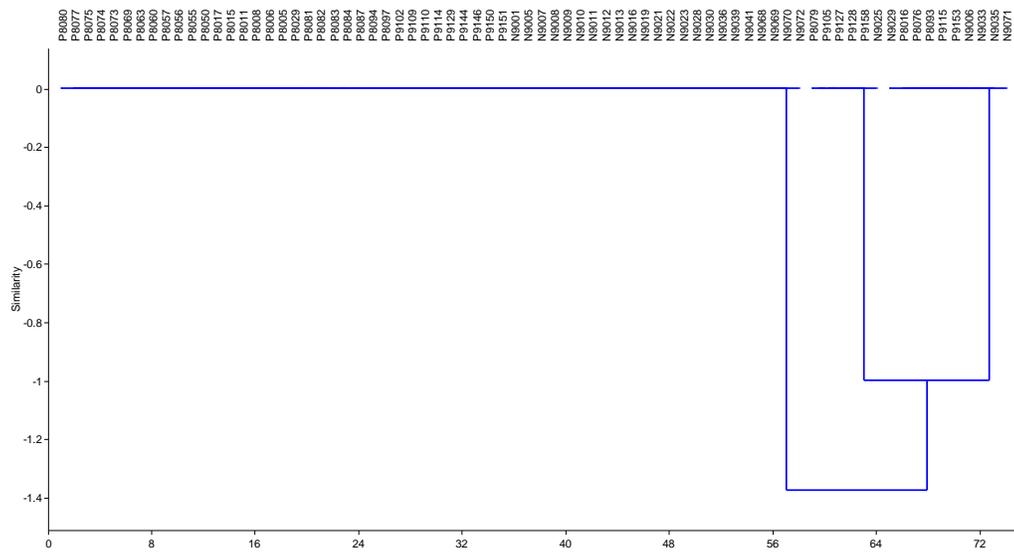


Figura 21. Agrupamiento de aislamientos de *Phytophthora infestans* de Nariño y Putumayo con base en la EC-50 de Cimoxanil (Metodología *in leaf*).

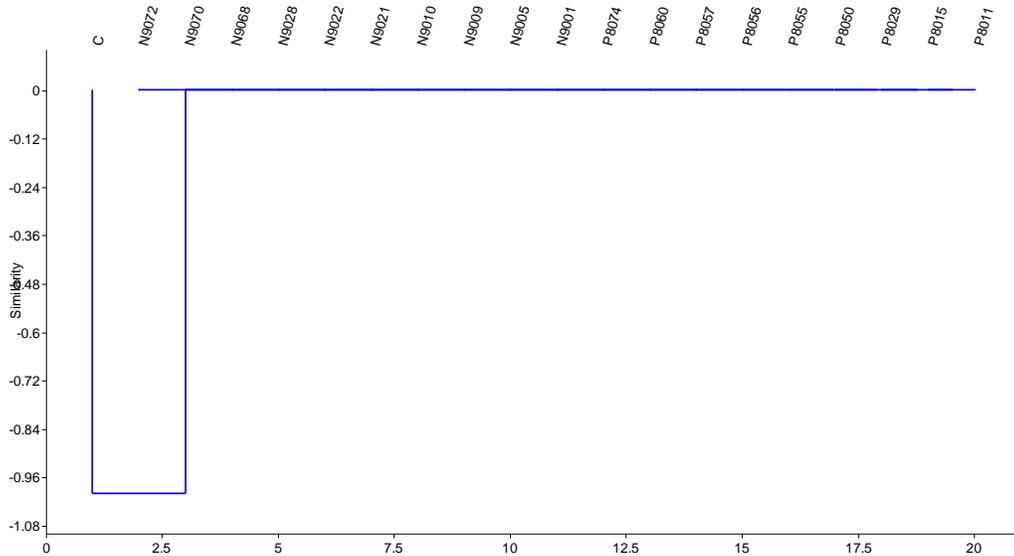


Figura 22. Agrupamiento de aislamientos de *Phytophthora infestans* de Nariño y Putumayo con base en la EC-50 de Cimoxanil (Metodología en placa).

Los resultados obtenidos en esta investigación se pueden comparar con investigaciones recientes realizadas por B.B. Pule y colaboradores (2012), quienes indican que es posible encontrar poblaciones sensibles y resistentes a fungicidas sistémicos dentro de un mismo cultivo, y que esta condición sugiere que los ingredientes activos ya no se utilizan tan intensivamente por parte del agricultor, o probablemente no existan diferencias en el fitness de los aislamientos resistentes y sensibles lo cual les confiere las mismas capacidades para su proliferación.

El conocimiento de la dinámica de la población del patógeno es útil para el desarrollo de adecuados programas de control del tizón tardío en solanáceas cultivables. A pesar de que cimoxanil, es calificado por la FRAC (2006) con un nivel de riesgo bajo, es posible que *P. infestans* presente cierto grado de resistencia a esta molécula, como consecuencia de su sistema de reproducción mixto, el elevado flujo de genotipos (facilitado por actividad humana) o el tamaño efectivo de su población, lo cual se considera como un riesgo para la evolución de la resistencia a fungicidas por parte del patógeno (McDonald & Linde, 2002).

Teniendo en cuenta esta situación y la experiencia de trabajo con *P. infestans* y con otros patógenos, las alternativas de control eficaz para el tizón tardío son insuficientes, ya que este tipo de organismos exhiben importantes capacidades para adaptarse a las toxinas, por lo cual sería poco probable el desarrollo de fungicidas

que sean permanentemente eficientes en el control de las enfermedades producidas por los fitopatógeno (Fry, 2008).

8. CONCLUSIONES.

- Todos los aislamientos de *Phytophthora infestans* sensu lato evaluados en esta investigación presentan tipo de apareamiento A1, como consecuencia se encuentra que son poblaciones de tipo clonal.
- Los aislamientos fueron altamente sensibles al ingrediente activo metalaxil, inhibiendo su crecimiento y esporulación desde la primera dosis evaluada (0.01µg/ml) en las dos metodologías empleadas.
- Para el caso del ingrediente activo cimoxanil los aislamientos de *Phytophthora infestans* sensu lato evaluados presentaron diferentes niveles de sensibilidad a la molécula, encontrando aislamientos sensibles (78%), intermedios (14%) y resistentes (8%), debido al uso intensivo de fungicidas comerciales que contienen cimoxanil lo cual ha llevado a las poblaciones a un proceso de adaptación a la molécula dando lugar a bajos porcentajes de inhibición y altos valores de EC-50.

9. RECOMENDACIONES.

- Realizar los cruces para la producción de oosporas en medios de cultivo modificados y con aislamientos de referencia procedentes de cultivos de tomate de árbol.
- Realizar cruces interespecíficos entre aislamientos estrechamente relacionados como es el caso de *Phytophthora andina* reportada para Ecuador con el fin de evaluar la producción de estructuras sexuales.
- Evaluar el tipo de apareamiento en poblaciones aisladas de otros hospederos de solanáceas como *Physalis peruviana*, *Solanum quitoense*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum muricatum* o *Solanum brevifolium*.
- Elaborar la línea base de susceptibilidad a los productos comerciales Ridomil® Gold y Curzate® M8 en los aislamientos evaluados en la presente investigación.

10. LITERATURA CITADA

- Abu-el Samen, F.M., Secor, G.A., Gudmestad, N.C. (2003). Variability in virulence among asexual progenies of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Phytopathol.* 93, 293-304.
- Adler, N.F., Erselius, L.J., Chacón, M.G., Flier, W.G., Ordóñez, M.E., Kroon, L., Forbes, G.A. (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.N. (1986). *Fitopatología*. México: Limusa, 756 p.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*, 5th edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*, pp. 717-723. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Aylor, D.E., Fry, W.E., Mayton, H., Andrade-Piedra, J. (2001). Quantifying the rate of release and escape of *Phytophthora infestans* sporangia from a potato canopy. *Phytopathology*, 91, 1189–1196.
- Brasier, C.M. (1992). Evolutionary biology of *Phytophthora*. Part I: genetic system, sexuality and the generation of variation. *Ann. Rev. Phytophthol.* 30, 153-177.
- Brent, K.J., Hollomon, D.W. (2007). *Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?*. Published by the Fungicide Resistance Action Committee. FRAC Monograph No. 1. ISBN 90-72398-07-6

- Calderón, H.J., Castro, M., Gilchrist, E., Márquez, E., Jaramillo, S. (2002). Caracterización de las poblaciones de *Phytophthora infestans* presentes en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca. En XXIII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología (ASCOLFI). Nuevas Tendencias en Fitopatología. Bogotá, Colombia, julio 3 – 6. Resúmenes, P46.
- Cárdenas, M., Grajales, A., Sierra, R., Rojas, A., González-Almario, A., Vargas, A. (2011). Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region. BMC Genet. 12:23.
- Cardozo de Miranda, B.E., Dias S.N., Reis, A. (2010). Mating type, mefenoxam sensitivity, and pathotype diversity in *Phytophthora infestans* isolates from tomato in Brazil. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.45, n.7, p.671-679.
- Carreño, N., Vargas, A., Bernal, A., Restrepo, S. (2007). Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros *Phytophthora*, *Alternaria* y *Ralstonia* en Colombia. Agron. colomb. v.25 n.2 Bogotá jul./dic.
- Céspedes, M.C., Cárdenas, M.E., Vargas, A.M., Rojas, A., Morales, J.G., Jiménez, P., Bernal, A.J., Restrepo, S. (2013). Physiological and molecular characterization of *Phytophthora infestans* isolates from the Central Colombian Andean Region. Rev Iberoam Micol. 30(2):81–87.
- Cooke, D.E.L., Cano, L.M., Raffaele, S., Bain, R.A., Cooke, L.R., *et al.* (2012). Genome Analyses of an Aggressive and Invasive Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen. PLoS Pathog 8(10): e1002940. doi:10.1371/journal.ppat.1002940
- Corbiere, R., Rekad, F.Z., Galfout, A., Andrivon, D., Bouznad, Z. (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of Algerian isolates of *Phytophthora infestans*. PPO-Special Report no. 14, 133 – 146.

- Day, J.P., Wattier, R.A.M., Shaw, D.S., Shattock, R.C. (2004). Phenotypic and genotypic diversity in *Phytophthora infestans* on potato in Great Britain, 1995–98. *Plant Pathology*, 53, 303–315.
- Dorrance, A.E., Inglis, D.A., Derie, M.L., Brown, C.R., Goodwin, S.B., Fry, W.E, Deahl, K. L. (1999). Characterization of *Phytophthora infestans* populations in western Washington. *Plant Dis.* 83:423-428.
- Drenth, A., Janssen, E.M., Govers, F. (1995). Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. *Plant Pathol.* 44:86-94.
- Drenth, A., Tas, I.C.Q., Govers, F. (1994). DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Eur. J. Plant Pathol.* 100:97-107.
- Egan, A.R., Murray, A., Mullins, S. (1995). Past history and future prospects for fungicides for the control of *Phytophthora infestans* on potatoes. In: Dowley LJ, Bannon E, Cooke LR, Keane T, O'Sullivan E, eds. *Phytophthora infestans* 150. Dublin, Irish Republic: Boole Press, 160–70.
- Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. St. Paul, Minnesota: APS Press. p. 42–95.
- Escudero, R. (2009). Metodología de evaluación de la sensibilidad a fungicidas QoI – Fenamidones: caso de estudio *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Agronomía colombiana*. Vol. 62, (1), 4773–4782.
- Escudero, R.M., Jaramillo, S., Cotes, J.M., Marín, M. (2005). Secuencia parcial del gen citocromo b de *Phytophthora infestans* y su relación con la resistencia al fenamidone. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 27 p.

- Fay, J.C. & Fry, W.E. (1996). Effects of hot and cold temperatures on the survival of oospores produced by United States strains of *Phytophthora infestans*. (Abstr.) *Phytopathology* 86:S121.
- Fernández-Northcote, E.N., Navia, O., Gandarillas, A. (1999). Bases de las Estrategias de Control Químico del Tizón Tardío de la Papa Desarrolladas por PROINPA en Bolivia. *Revista Latino Americana de la Papa*. 11:1-25.
- Flier, W.G., Grunwald, N.J., Fry, W.E., Turkensteen, L.J. (2001). Formation, production and viability of oospores of *Phytophthora infestans* from potato and *Solanum demissum* in the Toluca Valley, central Mexico. *Mycol Res*.105:998–1006.
- Forbes, G.A., Escobar, X.C., Ayala, C.C., Revelo, J., Ordoñez, M.E., Fry, B.A., Doucett, K., Fry, W.E. (1997). Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* 87:375-380.
- FRAC. 2006. QoI working group. En: <http://www.frac.info>.
- Fry, W.E., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Matuszak, J.M., Drenth, A., Tooley, P.W., Sujkowski, L.S., Koh, Y.J., Cohen, B.A., Spielman, L.J., Deahl, K.L., Inglis, D.A., Sandian, K.P. (1993). Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77:653-661.
- Fry, W.E. (2008). Plant diseases that changed the world *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* 9 (3), 385–402.
- Fry, W.E., Goodwin, S.B. (1997). Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience* (47): 363-371.
- Fry, W.E., Grünwald, N.J. (2010). Introduction to Oomycetes. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2010-1207-01.
- Gallegly, M.E., Galindo, J. (1960). The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 50:123-128.

- Gallegly, M.E., Galindo, J. (1958). Mating type and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48:274-277.
- García, C. (1997). A propósito de la introducción de aislamientos de *Phytophthora infestans* para la investigación en Colombia. *Agronomía Colombiana* 14:154-157.
- García, H., Marín, M., Jaramillo, S., Cotes, J.M. (2008). Sensibilidad de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* a cuatro fungicidas sistémicos. *Agronomía Colombiana* 26(1), 47-57.
- Garrett, K., Nelson, R., Mundt, C., Chacón, G., Jaramillo, R., Forbes G.A. (2001). The effects of host diversity and other management components on epidemics of potato late blight in the humid highland tropics. En: *Phytopathology* 91: 993-1000.
- Gavino, P.D., Smart, C.D., Sandrock, W., Miller, J.S., Hamm, P.B., Lee, T.Y., Davis, R.M., Fry, W.E. (2000). Implications of sexual recombination for *Phytophthora infestans* in the United States: generation of an aggressive lineage. En: *Plant Disease*. 84, 731-5.
- Ghimire, S.R., Hyde, K.D., Hodgkiss, I.J., Shaw D.S., Liew E.C. (2003). Variations in the *Phytophthora infestans* Population in Nepal as Revealed by Nuclear and Mitochondrial DNA Polymorphisms. En: *Phytopathology*. Volume 93, Number 2; p. 236-243.
- Gisi, U., Cohen, Y. (1996). Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology* 34:549-572.
- Gisi, U., Chin, K.M., Knapova, G., Kung Farber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H., Steinfeld, U. (2000). Recent developments in elucidating modes of

resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Prot.* 19:863-872.

Gisi, U., Walder, F., Resheat-Eini, Z., Edel, D., Sierotzki, H. (2010). Changes of Genotype, Sensitivity and Aggressiveness in *Phytophthora infestans* Isolates Collected in European Countries in 1997, 2006 and 2007. *J Phytopathol*, Blackwell Verlag GmbH. 10.1111/j.1439-0434.2010.01753.

Goodwin, S.B., Spielman, L.J., Matuszak, J.M., Bergeron, S.N., Fry, W.E. (1992). Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. *Phytopathology* 82, 955–61.

Goodwin, S. B., Drenth, A. (1997). Origen of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology* (10): 992-999.

Goodwin, S.B. (1997). The population genetics oi *Phytophthora*. *Phytopathology* 87:462-473.

Goodwin, S.B., Fry, W.E. (1995). Recent migrations of *Phytophthora infestans*. In: Dowley, LJ, Bannon, E, Cooke, LR, Keane, T and O'Sullivan, E, eds. *Phytophthora infestans* 150. Boole Press, Ltd., Dublin, pp. 89-95.

Goodwin, S.B., Sujkowski, L.S., Fry, W.E. (1996). Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology*, v.86, p.793-800.

Goss, E.M., Cardenas, M.E., Myers, K., Forbes, G.A., Fry, W.E., *et al.* (2011). The Plant Pathogen *Phytophthora andina* Emerged via Hybridization of an Unknown *Phytophthora* Species and the Irish Potato Famine Pathogen, *P. infestans*. *PLoS ONE* 6(9): e24543. doi:10.1371/journal.pone.0024543

Goss, E.M., Larsen, M., Chastagner, G.A., Givens, D.R., Grunwald, N.J. (2009). Population genetic analysis infers migration pathways of *Phytophthora*

ramorum in US nurseries. PLoS Pathog 5:e1000583. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000583.

Griffith, G.W., 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 Environmental Microbiology 64(10): 4007-4014.

Grünwald, N.J., Sturbaum, A.K., Romero Montes, G., Garay Serrano, E., Lozoya-Saldaña, H., Fry, W.E. (2006). Selection for fungicide resistance within a growing season in field populations of *Phytophthora infestans* at the center of origin. Phytopathology 96:1397-1403.

Grupo Genética y Evolución de Organismos Tropicales – GENPAT. (2011). 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. Informe presentado al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Howard, R.J., Ferrari, M., Genet, J.L., Stidham, M. (2000). Biology of Curzate® action against *Plasmopara viticola* infection on grape. AFPP-Sixième Conférence Internationale sur les maladies des plantes. Tours, Francia.

Jaramillo, S., Gutiérrez, L.A., Gilchrist R.E., Afanador, L., Morales, J.G. (2002). Sensibilidad de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary procedentes de diferentes zonas paperas colombianas a fungicidas sistémicos. Fitopatología Colombiana.

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

- Jmour, W. & Hamada, W. (2006). First report of A2 mating type of *Phytophthora infestans* in Tunisia using molecular markers and some observations on its metalaxyl resistance. *Tunisian Journal of Plant Protection* 1: 85-91.
- Judelson H.S., Spielman L.J., Shattock R.C. (1995). Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type *loci* in the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics*, 141: 503–512.
- Judelson, H.S. (1996a). Chromosomal heteromorphism linked to the mating type *locus* of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Molecular Gen Genetic*. 252: 155-161.
- Judelson, H.S. (1996b). Genetic and physical variability at the mating type *locus* of the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* 144:1005-1013.
- Kamoun, S. (2003). Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. *Eukar. Cell* 2, 191-199.
- Kato, M., Shimanuki, T. (2002). Reduction of fungicide applications by field resistant cultivars to potato late blight. 11-13 July. Hamburg, Germany.
- Keinath, A.P. (2007). Sensitivity of populations of *Phytophthora capsici* from South Carolina to mefenoxam, dimethomorph, zoxamide, and cymoxanil. *Plant Dis*. 91:743-748.
- Kim, K.J. & Lee, Y.S. (2002). Genetic DNA Marker for A2 mating type in *Phytophthora infestans*. *The Journal of Microbiology*, p.254-259.
- Knapova, G. & Gisi, U. (2002). Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* 51, 641–653.
- Lagos B, T., Benavides, C., Paredes, G.R., Lagos S.L. (2011). Distribución del tomate de árbol *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. y caracterización eco-

climática en las zonas del cultivo de Nariño. Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas - Vol. 5 - No.1 - pp. 11-19.

Lagos, L. (2002). Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en las zonas productoras de papa *Solanum tuberosum* L. en el departamento de Nariño. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Universidad del Valle.

Lamour, K.H., Hausbeck, M.K. (2000). Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology* 90:396-400.

MADR Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Apuesta Exportadora Agropecuaria 2006 – 2020.

Mascheretti, S., Croucher, P.J.P., Vettraino, A., Prospero, A., Garbelotto, M. (2008). Reconstruction of the Sudden Oak Death epidemic in California through microsatellite analysis of the pathogen *Phytophthora ramorum*. *Molecular Ecology* 17:2755–2768.

Mazáková, J., Zouhar, M., Ryšánek, P., Táborský, V. (2010). Mating Type Distribution of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic in 2007 and 2008. *Plant Protect. Sci.* Vol. 46, No. 3: 89–97.

McDonald, B.A., Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:349-379.

Mesa, V.M., Mideros, M.F., Jaramillo, S., Cotes-Torres, J.M., Lagos, L.E., Pineda, R.P., Marín-M, M. (2008). Variabilidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes del suroeste de Colombia. *Rev Iberoam Micol*; 25: 167-172

Mideros, M. (2008). 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. Trabajo de tesis para optar el título de Biólogo. Universidad de Nariño. Pasto.

Miller, J.S., Hamm, P.B., Johnson, D.A. (1997). Characterization of the *Phytophthora infestans* population in the Columbia Basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995. *Phytopathology* 87, 656–60.

Grunwald, N., Flier, W. (2005). The Biology Of *Phytophthora infestans* At Its Center Of Origin. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:171-190.

Nuninger, C., Steden, C., Staub, T. (1995). The contribution of Metalaxyl-based fungicide mixtures to potato late blight control. Páginas 122-129. En *Phytophthora infestans* 150. Boole Press Ltd. Dublin.

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

Oliva, R.F., Kroon, L., Chacon, G., Flier, W.G., Ristaino, J.B., Forbes, G.A. (2010b). *Phytophthora andina* sp nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the Andean highlands. *Plant Pathology* 59:613-625. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2010.02287.

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

Oliva, R.F. (2009). Occurrence of sympatric *Phytophthora* species in the highland of Ecuador. Swiss Federal Institute Of Technology Zurich. For the degree of Doctor of Science presented by Master of Science. Universidad Francisco de Vitoria. born Nov 18th, 1977 citizen of Ecuador.

- Páez, O., Gómez, L., Brenes, A., Valverde, R. (2001). Resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxyl en el cultivo de la papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 25(1): 33-44.
- Páez, O., Valverde, R., Gómez, L., Brenes, A. (2004). Determinación del tipo de apareamiento con marcadores moleculares en aislamientos de *Phytophthora infestans* recolectados en plantaciones de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28(2): 09-16.
- Páez, O., Valverde, R., Gómez, L., Brenes, A. (2005). Diversidad Genética de Aislamientos de *Phytophthora infestans* en Plantaciones de Papa en Costa Rica con el Uso de RAPDS. *Agronomía Costarricense* 29(1): 41-55. ISSN: 0377-9424.
- Pérez, W., Forbes, G. (2008). Manual técnico el tizón tardío de la papa. CIP. Perú, Lima.
- Pérez, W.G., Gamboa, J.S., Falcon, Y.V., Coca, M., Raymundo, R.M., Nelson, R.J. (2001). Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 91, 956–965.
- Pérez, W., Lara, J., Forbes, G.A. (2009). Resistance to metalaxyl-M and cymoxanil in a dominant clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Huánuco, Peru, an area of continuous potato production. *Eur J Plant Pathol* 125:87–95.
- Pule, B.B., Meitz, J.C., Thompson, A.H., Linde, C.C., Fry, W.E., Langenhoven, S.D., Meyers, K.L., Kandolo, D.S., Van Rij, N.C., McLeod, A. (2012). *Phytophthora infestans* populations in central, eastern and southern African countries consist of two major clonal lineages. *Plant Pathology* Doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02608.
- Raigosa, N., Amaya, M.C., Jaramillo, S., Lagos, L.E., Marín, M. (2009). Variabilidad genética de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans*

- (Mont) de Bary en solanáceas cultivadas en Colombia. rev. fac. nal. agr. medellín 62(1): 4761-4771.
- Reis, A., Ribeiro, F.H.S., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G. (2005). Sensitivity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans* to commonly used fungicides in tomato and potato crops. Plant Dis. 89:1279-1284.
- Ristaino, J.B. (2002). Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. Microbes Infect. 4:1369–77.
- Riveros, B.F., Sotomayor, R., Rivera, V., Secor, G., Espinoza, B. (2003). Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne.) de Bary a metalaxil en cultivo de papas en el norte de Chile. Agricultura técnica (chile) 63(2):117-124
- Samaucha, Y., Gisi, U. (1987). Use of two- and three-way mixtures to prevent development of resistance to phenylamide fungicides in *Phytophthora* and *Plasmopora*. En: Phytopathology. Vol. 77, p.1405-1409.
- Sampath A.K., Eswara N.R., Hariprasad K.R., Charitha M.D. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. Plant Pathology Bulletin 6:157-160.
- Santana, F.M., Gomes, C.B., Rombaldi, C., Bianchi, V.J., Reis, A. (2013). Characterization of *Phytophthora infestans* populations of southern Brazil in 2004 and 2005. Phytoparasitica. DOI 10.1007/s12600-013-0316.
- Shaw, D.S., Shattock, R.C. (1991). Genetics of *Phytophthora infestans*: The Mendelian approach, pp. 218-230. In J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw, and L. R. Cooke (Eds.), *Phytophthora*. British Mycological Society, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Silva, B., Jaramillo, S., Marín, M. (2009). Caracterización Genética De Aislamientos De *Phytophthora infestans* en Las Zonas Productoras De Papa De Los

- Departamentos De Antioquia, Boyacá, Cundinamarca Y Norte De Santander (Colombia). *Actual Biol* 31 (90): 5-20.
- Smart, C.D., Mayton, H., Mizubuti, E.S.G., Willmann, M.R., Fry, W.E. (2000). Environmental and genetic factors influencing self-fertility in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 90:987-994.
- Spielman, L.J., Drenth, A., Davidse, L.C., Sujkowski, L.J., Gu, W., Tooley, P.W., Fry, W.E. (1991). A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*?. *Plant Pathology* (40): 422-430.
- Sujkowski, L.S., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Fry, W.E. (1994). Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* 84:201-207.
- Tafur, R. 2006. Propuesta frutícola para Colombia y su impacto en la actividad económica, nacional, regional y departamental. pp. 47-68. En: Memorias Primer Congreso Colombiano de Horticultura. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá.
- The International Solanaceae Genome Project (SOL). (2004). Systems Approach to Diversity and adaptation. En: <http://www.sgn.cornell.edu/solanaceae-project/>
- Tooley, P.W., Fry, W.E., Villareal, M.J. (1985). Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *Journal of Heredity* 76 : 431-435.
- Turkesteen, L.J. (2000). Fungus diseases. International Potato Course: Production, Storage and Seed Technology. Wageningen, Holanda. 72p.
- Vargas, A.M., Quesada Ocampo, L.M., Céspedes, M.C., Carreño, N., González, A., Rojas, A., Zuluaga, A.P., Myers, K., Fry, W.E., Jiménez, P., Bernal, A.J., Restrepo, S. (2009). Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Colombia: First report of the A2 mating type. *Phytopathology* 99:82-88.

- Wang, W.Q., Ma, Z.Q., Zhang, X.F., Zhang, W.J., David, M. (2002). Resistance to fungicides, mating types and fitness of *Phytophthora infestans*. Acta Phytopathologic Sinica, 32, 278- 283.
- Yang, Y.H., Feng, L.X., Xie, B.Y., Feng, D.X. (2003). The resistance of *Phytophthora infestans* isolates to metalaxyl. Acta Phytophylacica Sinica, 30, 57-62.
- Yun Lee, T., Mizubuti, E., Fry, W.E. (1998). Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. Fungal Genetics and Biology 26, 118–130
- Zapata, J. (2002). Aspects on late blight (*Phytophthora infestans*) in Colombia. Country Profile. En: FERNANDEZ NORTHCOTE E. (ed.). Complementando la resistencia al tizón (*Phytophthora infestans*) en los Andes: Memorias, GILB, taller latinoamerica 1. Lima (Perú). CIP. Iniciativa Global para el Tizon Tardío (GILB). ISBN 92-9060-213-9. pp. 13-15.
- Ziogas, B.N., Davidse, L.C. (1987). Studies on the Mechanism of Action of Cymoxanil in *Phytophthora infestans*. Pesticide Biochemistry And Physiology 29, 89-96.
- <http://www.dupont.com>. Recuperado en: Marzo de 2013.
- http://www.helmmexico.com/es/marketing/pdf/manualtecnico/M_Cyrizate.pdf.
Recuperado en: Febrero de 2014.
- <http://www.putumayo.gov.co>. Recuperado en: Marzo de 2012.
- http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_110_Pan%20Frut%20NARI%C3%91O.pdf. Recuperado en: Marzo de 2012.

11. ANEXOS.

ANEXO A.

Tabla 2. Información de los aislamientos utilizados en las pruebas *in vitro* y molecular (CAPS) para la determinación de tipo de apareamiento (GENPAT, 2011).

AISLAMIENTO	PROCEDECENCIA	ESPECIE	HOSPEDERO	TA	LC	HM	SM	SC	MLG	A. S. <i>betaceum</i>	A. S. <i>tuberosum</i>	A. S. <i>phureja</i>
P8056	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	1	A	H	+
P8057	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	ND	ND	H	+
P8071	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	ND	ND	13	A	ND	ND
P8075	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	15	NA	H	-
P8077	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	1	A	-	H
P8093	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	I	7	A	-	+
P8099	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	ND	ND	ND	ND	ND	ND
P9127	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	R	ND	ND	H	H
P9129	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	ND	ND	H	H
P9146	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	ND	ND	H	H
P9151	Putumayo	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	2	NA	H	-
N9022	Nariño	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	ND	ND	H	+
N9025	Nariño	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	R	1	NA	-	+
N9036	Nariño	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	ND	ND	-	H
N9069	Nariño	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	ND	ND	H	-
N9070	Nariño	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum betaceum</i>	-	EC-3	Ia	S	S	1	A	H	H
US 940480*	New York (USA)	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	A2	US-8	Ia	S	ND	ND	ND	ND	ND
Z32	Zipacón (Cundinamarca)	<i>P. infestans</i>	<i>Solanum phureja</i>	A1	ND	ND	S	ND	ND	ND	ND	ND

TA: Tipo de Apareamiento; LC: Linaje Clonal; HM: Haplotipo Mitocondrial; SM: Sensibilidad a

Metalaxil; SC: Sensibilidad a Cimoxanil; MLG: A. S. *betaceum*: Agresividad en *S. betaceum*; A. S.

tuberosum: Agresividad en *S. tuberosum*; A. S. *phureja*: Agresividad en *S. phureja*.

ANEXO B.

Protocolos amplificación marcador CAPS para tipo de apareamiento en *Phytophthora infestans*.

1. Protocolo Kim & Lee, 2002.

Para el análisis de CAPS, las mezclas de reacción consistían de ADN genómico de 10ng, 0,5µM de cada cebador (W16-1 y W16-2), 200 µM de dNTPs, 1U de Taq polimerasa (Biotools, España) y buffer 1X. Para la amplificación, se empleó el siguiente perfil de PCR: 30seg a 94°C, 30seg a 55°C y 30seg a 72°C durante 30 ciclos. El ADN se amplificó utilizando los primers W16-1 (5'-AACACGCACAAGGCATATAAATGTA-3') y W16-2 (5'-GCGTAATGTAGCGTAACAGCTCTC-3'), los productos se purificaron por precipitación con etanol y se cortaron con la enzima de restricción *HaeIII*, se visualizó por electroforesis en gel de agarosa por tinción con bromuro de etidio (Judelson, 1995).

2. Protocolo Jmour & Hamada, 2006.

La mezcla de reacción de PCR consistió en 20ng de ADN genómico, 0,2 mM de dNTPs, 1U de Taq polimerasa (0,25µl), buffer 1X (2,5µl) y 0,5µM de cada primer

(W16-1 / W16-2). Para la amplificación del marcador, se utilizó el siguiente perfil de PCR: 30seg a 94°C, 30seg a 57°C y 30seg a 72°C durante 30 ciclos. El producto de PCR obtenido de 600 pb se cortó con la enzima de restricción *HaeIII* mediante la adición de 10 unidades de la enzima de restricción y se incubaron durante 2 horas a 37°C en buffer 1X. El producto de la digestión se separó mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizó la luz UV después de la tinción con bromuro de etidio.

3. Protocolo Mazáková, Zouhar, Ryšánek & Táborský, 2010.

Cada PCR se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 25µl, que consiste en 2,5µl de tampón Taq polimerasa 1X (Fermentas), 1,5µl de MgCl₂ (1,5 mM), 0,25µl de dNTPs (0,4µM de cada nucleótido), 0,4µl de cebador (0,4µM de cada cebador), 0,5µl de Taq polimerasa (2,5 U) (Fermentas), 18,85µl de H₂O y 1µl de ADN. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC 200 (MJ Research, Watertown, EE.UU.) siguiendo los siguientes parámetros: desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 29 ciclos de desnaturalización durante 1min a 94°C, hibridación del cebador 1min a 53°C, extensión del cebador durante 1min a 72°C y extensión final durante 4 min a 72°C. Para la amplificación por PCR se emplearon los cebadores W16-1 (5'-AACACGCACAAGGCATATAAATGTA-3') y W16-2 (5'-CGTAATGTAGCGTAACAGCTCTC-3'); los productos de PCR se cortaron con la enzima de restricción *HaeIII* (*BsuRI*) (Fermentas) (Judelson *et al.*, 1995). Estos productos de restricción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (1mg/ml) y se visualizó en un transiluminador UV.

4. Protocolo Gisi, Walder, Resheat-eini, Edel, & Sierotzki, 2010.

Las amplificaciones se realizaron en 20µl de reacción que contiene 2 µl de ADN genómico, 4 µl de buffer GoTaq (Promega, Southampton, Reino Unido), 0,2mM de cada dNTPs, 0,2 µM de W16-1 y W16-2, y 2U de GoTaq polimerasa (Promega). Los parámetros de amplificación de la PCR fueron: 5min a 94°C seguido de 30 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 58°C y 1min a 72°C, finalmente se mantuvo durante 5min a 72°C. Los productos de PCR se cortaron con la enzima de restricción *HaeIII* para distinguir los dos tipos de apareamiento. Los productos de restricción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1,5%).

ANEXO C.

Protocolo Determinación Tipo De Apareamiento Mediante Marcadores Moleculares Tipo CAPS.

La amplificación se llevó a cabo utilizando una mezcla que consistió en 2µl de buffer Taq pol (1X, Fermentas), 2.2µl de MgCl₂ (2.75mM), 0.4µl de dNTPs (0.2mM), 1µl de cada primer W16-1/2 (0.5µM), 0,2µl de Taq polimerasa (1U, Fermentas), 3.2µl de H₂O y 10µl de DNA (10ng); para la amplificación del marcador CAPS, se utilizó un perfil de PCR de 30 ciclos con desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 57°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos, extensión final a 72°C durante 10 minutos y store 4°C, en un termociclador MyGene 96 marca Bioner.

En el caso de la digestión se emplearon dos tipos de enzimas: BsuRI (*HaeIII*) y FastDigest HaeIII (BsuRI) (Thermo Scientific), encontrando que la enzima Fast Digest HaeIII no realizó el corte esperado en los productos amplificados, sin embargo con la enzima BsuRI (*HaeIII*) si fue posible realizar el corte con las siguientes condiciones de digestión: la mezcla consistió en 9.545µl de H₂O, 3,1µl de Buffer R, 0.155µl de DTT, 0.2µl de BsuRI (*HaeIII*) y 5µl del producto de PCR, las muestras fueron incubadas a 37°C durante tres horas un termociclador MyGene 96 marca Bioner.

ANEXO D.

Tabla 4. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 5.613E-38) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología *in leaf*.

CONCENTRACIONES	CONTROL	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
CONTROL	0					
0.01 µg/ml	1.32E-24	0				
0.1 µg/ml	1.32E-24	1	0			
1 µg/ml	1.32E-24	1	1	0		
2.5 µg/ml	1.32E-24	1	1	1	0	
5 µg/ml	1.32E-24	1	1	1	1	0

ANEXO E.

Tabla 5. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 1.68E-09) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología en placa.

CONCENTRACIONES	CONTROL	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
CONTROL	0					
0.01 µg/ml	1.02E-06	0				
0.1 µg/ml	1.02E-06	1	0			
1 µg/ml	1.02E-06	1	1	0		
2.5 µg/ml	1.02E-06	1	1	1	0	
5 µg/ml	1.02E-06	1	1	1	1	0

ANEXO F.

Tabla 6. Prueba de Kruskal-Wallis (p-same: 0.1248) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología *in leaf*.

CONCENTRACIONES	CONTROL	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
CONTROL	0					
0.01 µg/ml	0.3496	0				
0.1 µg/ml	0.3496	1	0			
1 µg/ml	0.3496	1	1	0		
2.5 µg/ml	0.3496	1	1	1	0	
5 µg/ml	0.3496	1	1	1	1	0

ANEXO G.

Tabla 7. Prueba de Kruskal-Wallis (p -same: 1.684E-09) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Metalaxil en la metodología en placa.

CONCENTRACIONES	CONTROL	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml	2.5µg/ml	5µg/ml
CONTROL	0					
0.01 µg/ml	1.02E-06	0				
0.1 µg/ml	1.02E-06	1	0			
1 µg/ml	1.02E-06	1	1	0		
2.5 µg/ml	1.02E-06	1	1	1	0	
5 µg/ml	1.02E-06	1	1	1	1	0

ANEXO H.

Tabla 8. Esporulaci3n, 1rea de crecimiento y tasa de esporulaci3n de aislamientos de *Phytophthora infestans* en agar tomate-arveja sin suplementar con i.a Metalaxil.

AISLAMIENTO	ESPORULACI3N (Esporangios/ml)	1REA DE CRECIMIENTO FINAL (cm ²)	TASA DE ESPORULACI3N (Esporangios/ cm ²)
N9001	4560000	48.85	93346.98
N9005	630000	43.85	14367.16
N9009	17160000	53.37	321528.94
N9010	30000	40.92	733.14
N9021	12360000	42.285	292302.23
N9022	3405000	44.08	77245.91
N9028	4830000	52.735	91590.02
N9068	1980000	39.23	50471.58
N9070	4500000	51.12	88028.17
N9072	3615000	39.525	91461.10
P8006	21120000	57.78	365524.40
P8011	735000	61.645	11923.11
P8015	5805000	33.9	171238.94
P8029	5850000	34.69	168636.49
P8050	12300000	59.44	206931.36
P8055	4875000	41.52	117413.29
P8056	3990000	31.22	127802.69
P8057	150000	44.585	3364.36
P8060	12900000	54.23	237875.71
P8074	4605000	57.785	79691.96

ANEXO I.

Tabla 9. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 3.979E-44) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología *in leaf*.

CONCENTRACIONES	CONTROL	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml	3µg/ml	5µg/ml
CONTROL	0					
0.01 µg/ml	1.32E-24	0				
0.1 µg/ml	1.32E-24	3.65E-04	0			
1 µg/ml	1.32E-24	6.15E-06	1	0		
3 µg/ml	1.32E-24	2.30E-06	1	1	0	
5 µg/ml	1.32E-24	2.30E-06	1	1	1	0

ANEXO J.

Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 9.164E-10) (Bonferroni Corrected) para porcentaje de inhibición entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología en placa.

CONCENTRACIONES	CONTROL	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml	3µg/ml	5µg/ml
CONTROL	0					
0.01 µg/ml	1.02E-06	0				
0.1 µg/ml	1.02E-06	1	0			
1 µg/ml	1.02E-06	1	1	0		
3 µg/ml	1.02E-06	1	1	1	0	
5 µg/ml	1.02E-06	1	1	1	1	0

ANEXO K.

Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis (p -same: 0.3379) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología *in leaf*.

	CONTROL	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml	3µg/ml	5µg/ml
CONTROL	0					
0.01 µg/ml	1	0				
0.1 µg/ml	1	1	0			
1 µg/ml	1	1	1	0		
3 µg/ml	0.7301	1	1	1	0	
5 µg/ml	0.7301	1	1	1	1	0

ANEXO L.

Tabla 12. Prueba de Kruskal-Wallis (p-value: 6.398E-09) (Bonferroni Corrected) para tasa de esporulación entre concentraciones del ingrediente activo Cimoxanil en la metodología en placa.

	CONTROL	0.01µg/ml	0.1µg/ml	1µg/ml	3µg/ml	5µg/ml
CONTROL	0					
0.01 µg/ml	2.06E-05	0				
0.1 µg/ml	1.38E-06	1	0			
1 µg/ml	5.91E-06	1	1	0		
3 µg/ml	1.02E-06	1	1	1	0	
5 µg/ml	1.02E-06	1	1	1	1	0

ANEXO M.

Tabla 13. Esporulaci3n, 1rea de crecimiento y tasa de esporulaci3n de aislamientos de *Phytophthora infestans* en agar tomate-arveja sin suplementar con i.a Cimoxanil.

AISLAMIENTO	ESPORULACI3N (Esporangios/ml)	1REA DE CRECIMIENTO FINAL (cm ²)	TASA DE ESPORULACI3N (Esporangios/ cm ²)
N9001	4950000	57.78	85669.7819
N9005	720000	61.645	11679.7794
N9009	18420000	33.9	543362.832
N9010	1620000	34.69	46699.337
N9021	16800000	59.44	282637.954
N9022	7560000	41.52	182080.925
N9028	7905000	31.22	253203.075
N9068	1575000	44.585	35325.7822
N9070	6525000	54.23	120320.856
N9072	2325000	57.785	40235.3552
P8006	22260000	48.85	455680.655
P8011	2055000	43.85	46864.3101
P8015	3090000	53.37	57897.6953
P8029	3705000	40.92	90542.522
P8050	6150000	42.285	145441.646
P8055	3795000	44.08	86093.4664
P8056	3705000	52.735	70256.9451
P8057	600000	39.23	15294.4175
P8060	8850000	51.12	173122.066
P8074	5220000	39.525	132068.311

ANEXO N.

Tabla 14. Clasificación de aislamientos de *Phytophthora infestans* aislada de *Solanum betaceum* según los valores de dosis media efectiva (EC-50) del ingrediente activo Cimoxanil en metodología *in leaf* y placa.

AISLAMIENTO	Metodología <i>in leaf</i>		Metodología en placa	
	EC-50	CATEGORÍA	EC-50	CATEGORÍA
P8005	2.79911E-13	S	ND	ND
P8006	1.2278E-05	S	0	S
P8008	0	S	ND	ND
P8011	1.09608E-06	S	0	S
P8015	2.45426E-23	S	0	S
P8016	2.278300842	I	ND	ND
P8017	0	S	ND	ND
P8029	0	S	0	S
P8050	0.027502811	S	4.82E-24	S
P8055	4.1557E-39	S	0.02854492	S
P8056	0.010829445	S	0	S
P8057	0.001683787	S	0	S
P8060	0.005439876	S	1.19E-73	S
P8063	0	S	ND	ND
P8069	0.022460138	S	ND	ND
P8073	6.43908E-06	S	ND	ND
P8074	0.099310918	S	0	S
P8075	0.000719686	S	ND	ND
P8076	2.399713003	I	ND	ND
P8077	0	S	ND	ND
P8079	23.61513043	R	ND	ND
P8080	0	S	ND	ND
P8081	0	S	ND	ND
P8082	0.014700754	S	ND	ND
P8083	0	S	ND	ND
P8084	0	S	ND	ND
P8087	0	S	ND	ND
P8093	3.974840698	I	ND	ND

P8094	0	S	ND	ND
P8097	5.68834E-11	S	ND	ND
P9102	0	S	ND	ND
P9105	150.8199405	R	ND	ND
P9109	0.000111608	S	ND	ND
P9110	0	S	ND	ND
P9114	7.88805E-07	S	ND	ND
P9115	5.600293657	I	ND	ND
P9127	12.72021295	R	ND	ND
P9128	48.33221494	R	ND	ND
P9129	0	S	ND	ND
P9144	0	S	ND	ND
P9146	0	S	ND	ND
P9150	0	S	ND	ND
P9151	0	S	ND	ND
P9153	9.514876187	I	ND	ND
P9158	16.53606142	R	ND	ND
N9001	0	S	0	S
N9005	0	S	0	S
N9006	1.273914224	I	ND	ND
N9007	0	S	ND	ND
N9008	0	S	ND	ND
N9009	0	S	0	S
N9010	0	S	0	S
N9011	0.009753999	S	ND	ND
N9012	0	S	ND	ND
N9013	0	S	ND	ND
N9016	0	S	ND	ND
N9019	0	S	ND	ND
N9021	0	S	0	S
N9022	0	S	0	S
N9023	0	S	ND	ND
N9025	42.97004704	R	ND	ND
N9028	0	S	0	S
N9029	2.872204098	I	ND	ND
N9030	0	S	ND	ND
N9033	1.70125428	I	ND	ND
N9035	0.650478327	I	ND	ND

N9036	0	S	ND	ND
N9039	0	S	ND	ND
N9041	1.34946E-12	S	ND	ND
N9068	0.000118277	S	0	S
N9069	0	S	ND	ND
N9070	0	S	0	S
N9071	3.132988883	I	ND	ND
N9072	0.052083709	S	0.00180985	S

S: Sensible; I: intermedio; R: Resistente; ND: No Determinado.