

# Variabilidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes del suroeste de Colombia

Victoria María Mesa Salgado<sup>1</sup>, María Fernanda Mideros<sup>2</sup>,  
Sonia Jaramillo-Villegas<sup>3</sup>, José Miguel Cotes-Torres<sup>3</sup>,  
Luz Estela Lagos Mora<sup>2</sup>, Rosana Paola Pineda<sup>1</sup> &  
Mauricio Marín Montoya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia; <sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia; <sup>3</sup>Laboratorio de Estudios Moleculares, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia

## Resumen

La gota o tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* es una de las enfermedades más limitantes en diversos cultivos de solanáceas en el mundo. Este patógeno es especialmente problemático en las zonas andinas altas, donde dichos cultivos se desarrollan bajo condiciones de alta humedad y siembra continua durante todo el año. El objetivo de este trabajo fue aumentar la información disponible sobre la biología de *P. infestans*, especialmente con respecto a su variabilidad genética en el suroeste de Colombia, región donde confluyen cultivos de diferentes solanáceas susceptibles a este patógeno. La evaluación se realizó mediante la utilización de marcadores moleculares AFLP con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI* y diferentes combinaciones de cebadores. Los resultados obtenidos indicaron un bajo nivel de variación genética entre los 26 aislamientos evaluados, presentándose sólo 18 bandas polimórficas de los 135 amplicones obtenidos (13,43%), un índice de diversidad de Nei de 0,04 y un índice de Shannon de 0,06. A pesar del alto grado de similitud encontrado en la población, el dendrograma generado por el método UPGMA permitió dividir la población en dos grandes grupos. El primero de ellos presentaba aislamientos procedentes de papa (*Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*), mientras que el segundo incluyó solo aislamientos obtenidos de tomate de árbol (*Solanum betaceum*). Uno de los aislamientos evaluados (C8) no se agrupó con ninguno de los anteriores grupos, aunque compartió un alto nivel de similitud con éstos (0,86). Los resultados apoyan la hipótesis de la estructuración poblacional de *P. infestans* en función del hospedante; sin embargo, esta situación requiere ser verificada con evaluaciones de patogenicidad cruzada.

## Palabras clave

AFLP, Marcadores moleculares, *Phytophthora infestans*, Solanaceae, Tizón tardío

## Genetic variability of *Phytophthora infestans* isolates from south-western Colombia

## Summary

Late blight caused by *Phytophthora infestans* is one of the most limiting diseases in solanaceous crops in the world. This pathogen is a main constraint in the highland Andes, where these plants are grown under high humidity conditions and continuous cropping. The aim of this research was to increase the available information on the biology of *P. infestans*, specifically on its level of genetic variation in south-western Colombia, an area where various solanaceous crops susceptible to this pathogen converge. The study was carried out by using AFLP molecular markers with the restriction enzymes *EcoRI* and *MseI* and different primer combinations. Results indicated a low level of genetic variation among the 26 isolates evaluated, with only 18 polymorphic bands out of 135 amplicons obtained (13.43%), a Nei's genetic diversity index of 0.04, and a Shannon's information index of 0.06.

### Dirección para correspondencia:

Dr. Mauricio Marín Montoya  
Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín  
A.A. 3840 Medellín  
Colombia  
Fax: +57 (4) 4309332.  
E-mail: mamarinm@unal.edu.co

Aceptado para publicación el 18 de abril de 2008

The UPGMA dendrogram allowed dividing the population in two main groups, the first of them having the isolates collected from potato (*Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*), while the second one included isolates obtained from tree tomato (*Solanum betaceum*). One of the isolates (C8) was located outside of these groups, although it shared a high level of similarity with them (0.86). The results support the hypothesis of population structure of *P. infestans* based on host; however, this situation needs to be verified with cross pathogenicity assays.

**Key words** AFLP, Late blight, Molecular markers, *Phytophthora infestans*, Solanaceae

La gota o tizón tardío es la enfermedad más limitante de los cultivos de papa, tomate y otras solanáceas en el mundo. Su agente causal, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es un oomicete heterotálico que presenta dos tipos de apareamiento (A1 y A2), situación que define en buena parte la estructura poblacional del patógeno en las diferentes regiones del mundo [11]. Hasta principios de la década de 1980, sólo se habían detectado ambos tipos de apareamiento en el Valle de Toluca (México), razón por la cual se consideraba esta zona como el origen de *P. infestans*. En otras latitudes, sólo se había descrito el tipo A1 como el causante de la enfermedad [12]. A partir de 1981 se documentó la distribución del tipo de apareamiento A2 en varios países de Europa, Oriente Medio, Asia y Sudamérica [9], lo que condujo a que la población A1 fuera desplazada por una nueva variante A1/A2. Dicha población es el resultado de la reproducción sexual entre ambos tipos y se caracteriza por ser altamente virulenta y variable, lo cual le ha permitido adaptarse a nuevos hospedantes y a diferentes condiciones medioambientales [9,10]. Alternativamente, existe una teoría que indica que el patógeno es originario de los Andes suramericanos, región de donde proceden sus principales hospedantes, cultivados y silvestres [1,21]. Sin embargo, la ausencia de reproducción sexual del patógeno en los Andes contradice dicha hipótesis, aunque los hallazgos recientes de ambos tipos de apareamiento sobre un mismo hospedante (*Solanum muricatum*) en Ecuador y la presencia de genotipos exóticos del patógeno sobre hospedantes silvestres como *Solanum ochranthum*, *Solanum hispidum* y *Brugmansia sanguinea* han dado un nuevo auge a esta teoría [3].

El estudio de la estructura metapoblacional de *P. infestans* en los Andes Sudamericanos ha aportado interesantes resultados sobre el nivel de diversidad del patógeno. Actualmente, los linajes de *P. infestans* que han sido descritos en Sudamérica afectando cultivos de papa son aquellos derivados del linaje EC1, cuyos aislamientos se caracterizan por presentar el tipo de apareamiento A1, perfiles isoenzimáticos *Gpi* 90/100 – *Pep* 96/100 y haplotipo mitocondrial IIa. Por contra, en cultivos de tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*), el linaje asociado corresponde al US-1 (A1, *Gpi* 86/100, *Pep* 92/100 y Ib) y en tomate de árbol (*S. betaceum*) al EC-3 (A1, *Gpi* 86/100, *Pep* 76/100 y Ia) [3].

En Ecuador se han descrito dos linajes, EC-2.1 y EC-2.2, sobre solanáceas silvestres de la sección *Anarrhichomenum*, que comparten el mismo patrón isoenzimático (*Gpi* 100/100 – *Pep* 76/100) pero que divergen en sus haplotipos mitocondriales y tipo de apareamiento (Ia, A1, e Ic, A2, respectivamente) [3,20]. Además, se ha demostrado que la hipótesis de especificidad linaje clonal-hospedante no es absoluta, por cuanto sobre la especie cultivada

*S. muricatum* (pepino de agua) se detectaron aislamientos de *P. infestans* pertenecientes tanto al linaje clonal US-1 como al EC-2.1 [3].

A pesar de la condición predominantemente clonal de las poblaciones de *P. infestans*, determinada mediante las evaluaciones fenotípicas y genotípicas descritas anteriormente, estudios recientes, que utilizan marcadores moleculares neutrales, como RAPD y AFLP, han demostrado que existe un grado apreciable de variabilidad genética de los linajes de *P. infestans*, variación que incluso se ha manifestado en el estudio de poblaciones asexuales en las que solo se presenta un tipo de apareamiento [2,18,22].

En los estudios de caracterización de *P. infestans* en Colombia, se ha encontrado que todos los aislamientos analizados pertenecen al tipo de apareamiento A1, lo cual posiblemente indica la ausencia de reproducción sexual del patógeno en el país [15]. Además, se ha determinado que, en su gran mayoría, dichos aislamientos representan los haplotipos mitocondriales IIa y Ib, que corresponden a los linajes clonales EC-1 y US-1, respectivamente [15]. Recientemente, en un estudio de variabilidad genética utilizando la técnica RAPD, que incluyó una población de 35 aislamientos de *P. infestans* obtenidos en diferentes hospedantes y regiones geográficas de Colombia, se encontró la existencia de una variación genética apreciable dentro de cada linaje, situación no explicable por la condición clonal de *P. infestans* en Colombia [4].

Ya que entre los resultados de ese trabajo los aislamientos no se agruparon en función del hospedante, situación frecuentemente encontrada en otras regiones del mundo [3], se planteó la presente investigación a partir del estudio de una población de *P. infestans* procedente del suroeste de Colombia, una región altoandina donde confluyen cultivos de papa y tomate de árbol, dos hospedantes del patógeno que por corresponder a diferentes linajes genéticos son ideales para la evaluación de la hipótesis de especificidad patogénica de este organismo.

## Materiales y métodos

**Aislamientos de *P. infestans*.** Se evaluaron 26 aislamientos de *P. infestans* procedentes de cultivos de papa y tomate de árbol de diferentes municipios del departamento de Nariño, Colombia, recogidos entre los años 2005 y 2006 (Tabla 1). Los aislamientos fueron obtenidos a partir de lesiones individuales de folíolos con síntomas de gota o tizón tardío. La purificación incluyó la siembra sobre rodajas de papa, variedad Tuquerreña (sin genes mayores de resistencia). La transferencia, una vez desarrollado el micelio, se realizó en medio agar-centeno (para un litro de medio: 25 g de harina de centeno, 18 g de agar, 20 g de

**Tabla 1.** Aislamientos de *Phytophthora infestans* recogidos de papa (*Solanum tuberosum* y *Solanum phureja*) y tomate de árbol (*Solanum betaceum*) en el suroeste de Colombia.

Aislamiento	Código de colección*	Hospedante	Localidad
C1	N135	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C2	N150F	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C3	N146C	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C4	N75	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C5	N146F	<i>S. phureja</i>	Pasto/Nariño
C6	N149B	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C7	N149A	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C8	N77	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C9	N13	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C10	N144A	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C11	N27	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C12	N144B	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C13	N146E	<i>S. phureja</i>	Pasto/Nariño
C14	N132	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C15	N112	<i>S. tuberosum</i>	Pasto/Nariño
C16	NSb13703	<i>S. betaceum</i>	San Juan/Nariño
C17	NSb13503	<i>S. betaceum</i>	Genoy/Nariño
C18	Nsb13903	<i>S. betaceum</i>	Obonuco/Nariño
C19	NSb14304	<i>S. betaceum</i>	La Vega/Nariño
C20	NSb14903	<i>S. betaceum</i>	Consaca/Nariño
C21	NSb13804	<i>S. betaceum</i>	Ipiales/Nariño
C22	NSb14003	<i>S. betaceum</i>	Catambuco/Nariño
C23	NSb14103	<i>S. betaceum</i>	Buesaco/Nariño
C24	NSb14404	<i>S. betaceum</i>	San Bernardo/Nariño
C25	5B IX13	<i>S. betaceum</i>	Nariño
C26	127	<i>S. tuberosum</i>	Cabrera/Nariño

\* Código de los aislamientos en la colección general de *P. infestans* de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

sacarosa). Los aislamientos fueron mantenidos bajo condiciones controladas a 20 °C, con fotoperíodo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad y una humedad relativa entre el 85 y el 90%.

**Caracterización con marcadores AFLP.** La metodología empleada para el análisis de variabilidad genética de la población de *P. infestans* mediante AFLP fue una versión modificada del método descrito por Vos et al. [23].

**Extracción del ADN.** Se tomaron bloques de agar de 1 cm<sup>2</sup> de los aislamientos purificados en medio sólido para proceder a su siembra en medio líquido de arveja (un litro de medio: 25 g de arveja, 20 g de sacarosa). Tras 15 días de incubación a 18 °C se procedió a la filtración del micelio en condiciones de vacío para dar inicio a la extracción de ADN. Para ello, el micelio obtenido fue macerado con nitrógeno líquido, llevándose 200 µl a un tubo eppendorf. Se añadieron 300-400 µl de tampón CTAB 2X (CTAB 2% (p/v); 100 mM Tris HCl, pH 8.0; 1,4 M de NaCl; 20 mM EDTA, pH 8.0), incubándose las muestras a 65 °C durante 30 min. Se añadió posteriormente un volumen de fenol:cloroformo, centrifugando a 13.000 rpm durante 15 min. Se extrajo el sobrenadante y se le añadió un volumen de cloroformo, centrifugando a 13.000 rpm durante 10 min. Posteriormente, los ácidos nucleicos fueron precipitados mediante la adición de 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio. Se dejaron los tubos a -20 °C, y se centrifugaron después durante 15 min a 13.000 rpm. El pellet generado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 200 µl de agua destilada estéril, para finalmente eliminar el ARN mediante la adición de 5 µl de ARNasa (10 mg/ml). La integridad y cantidad del ADN obtenido fue medida mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, suplementado con 3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).

**Digestión del ADN.** Las reacciones de digestión se llevaron a cabo con 5 µl de ADN (100 ng/µl); 2X de tampón Tango Y+; 1,25 U de las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*; 1mM de DTT y un volumen total de 12,5 µl. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 2 h y las reacciones detenidas a 70 °C durante 15 min, visualizándose los patrones electroforéticos en geles de agarosa al 1%, suplementados con bromuro de etidio (10 mg/ml).

**Ligación de adaptadores.** Los fragmentos de restricción fueron ligados a los adaptadores *EcoRI* (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3') y *MseI* (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 5'-TACTCAGGACTCAT-3') mediante el empleo de 5 pmol/µl del adaptador *EcoRI*; 50 pmol/µl del adaptador *MseI*; 1X tampón de enzima; 0,5 mM de DTT; 0,4 mM de ATP y 1U de la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas, Vilnius, Lithuania). El volumen de reacción fue de 25 µl, incluyendo los 12,5 µl de solución de digestión. La mezcla se incubó a 20 °C durante 2 h y se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Para la visualización de la digestión-ligación, se tomaron 5 µl de la solución y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

**Preamplificación.** Se utilizaron los cebadores +0 *EcoRI* (5'-GACTGCGTACCAATT-3'), +0 *MseI* (5'-GATGAGTCCTGAGTA-3'), +1 (EA - MG, EA - MC y EA - MA). Las reacciones incluían 5 µl de ADN digerido y ligado; 1,25 µl de cada cebador (10 pmol/µl); 0,8 mM de dNTPs; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1X de tampón de enzima (100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 500 mM KCl; 0,8% Nonidet P40); 2 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Fermentas) en un volumen final de 25 µl. Las reacciones se efectuaron en un termociclador Biometra T3 con el siguiente programa: 2 min a 94 °C, seguido de 20 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Finalmente, los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5%.

**Amplificación selectiva.** Se tomaron 5 µl de los productos de preamplificación para realizar la PCR, utilizando cinco pares de cebadores con dos nucleótidos selectivos: EAA - MCT, EAA - MCC, EAA - MAC, EAT - MAC y EAA - MCG. La solución de amplificación consistió en un volumen final de 20 µl con 1 pmol/µl del cebador derivado de *EcoRI*; 5 pmol/µl del cebador derivado de *MseI*; 0,8 mM de dNTPs; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1X de tampón de enzima y 2U de Taq ADN polimerasa recombinante (Fermentas). El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de 94 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min, seguido de 12 ciclos con las mismas condiciones de desnaturalización y extensión, pero con una disminución de 0,7 °C/ciclo en la temperatura de unión de los cebadores y 26 ciclos de 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min. El programa finalizó con una extensión de 72 °C durante 5 min. Los productos de la amplificación fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

**Determinación del perfil de bandas.** Se efectuó una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (6%) en una cámara de electroforesis Biorad con geles de 25 cm. Se realizó una electroforesis inicial a 1500 V y 55 °C para cargar después 7 µl de la muestra (previamente desnaturalizada a 95 °C durante 6 min), 2 µl de tampón de carga (cantidades para 100 ml: 0,05 g azul de bromofenol; 0,05 g xilene cianol, 10ml10 mL TBE 10X) y realizar la electroforesis a 1900 V durante 2,5 h.

**Tinción con nitrato de plata.** Se colocó el gel en una solución fijadora de etanol al 10% durante 8 min, transfiriéndose luego a ácido nítrico al 1% durante 3 min y

lavando con agua desionizada durante 2-3min. Posteriormente, se adicionó la solución de tinción (cantidades para un litro: 1g nitrato de plata, 1500 µl formaldehído), dejando el gel durante 20 min, y la solución de revelado (cantidades para 500 ml: 15g carbonato de sodio, 750 µl formaldehído, 100 µl tiosulfato de sodio). Finalmente, se añadió la solución fijadora (ácido acético glacial al 10%), dejándola actuar durante 5 min, y se lavó el gel con agua destilada desionizada para proceder a la lectura de las bandas.

**Análisis de datos.** Se realizó un Análisis de Cluster mediante la construcción de una matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda en los 26 aislamientos evaluados. Esta información se utilizó para calcular una matriz de similitud utilizando el índice de Jaccard mediante el programa SAS (SAS Institute, Cary, NC), y a partir de ésta se construyó un dendrograma mediante el método UPGMA utilizando los procedimientos Cluster y Tree. Posteriormente, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para subdividir la variación genética total entre y dentro de los grupos seleccionados con base en el dendrograma. Se verificó la posible diferencia estadística entre éstos mediante el estadístico  $F_{st}$  con  $1 \times 10^4$  permutaciones [24]. El nivel de diversidad genética se calculó en base al número de bandas polimórficas, el índice de diversidad genética de Nei y el índice de diversidad genotípica de Shannon mediante el software POPGENE (University of Alberta, Canadá).

## Resultados

**Diversidad genética.** Con los cinco pares de cebadores utilizados se obtuvo un total de 135 amplicones con tamaños que oscilaron entre 80 y 970 pb. Se observaron tan sólo 18 bandas polimórficas (13,43%), lo que se reflejó en el bajo índice de diversidad de Nei,  $h=0,04$  (desviación estándar=0,123) y de diversidad genotípica de Shannon,  $I=0,06$  (desviación estándar=0,179). A pesar del alto grado de similitud encontrado en la población, el dendrograma UPGMA generado dividió los aislamientos en dos grandes grupos; el primero de ellos (grupo I) incluyó los diez aislamientos procedentes de cultivos de tomate de árbol (Figura). El grado de variación de este grupo fue muy bajo, tal como se desprende del coeficiente de similitud generado, que fue superior a 0,91. En el segundo grupo (II) se ubicaron solamente los aislamientos obtenidos de papa, que se dividieron en dos subgrupos relacionados con un

coeficiente de similitud de 0,90 (Figura). Finalmente, uno de los aislamientos procedentes de papa (C8) se ubicó por fuera de ambos grupos, aunque compartió un alto nivel de similitud con éstos (0,86) (Figura).

A pesar del bajo grado de diversidad genética encontrada en la población evaluada, el número de genotipos detectados fue alto (24); veintidós de ellos fueron únicos y dos presentaron frecuencias de dos aislamientos. Sin embargo, el número de loci que diferían entre aislamientos fue muy bajo entre los genotipos detectados.

**Amova.** El AMOVA (Tabla 2) demostró que la variación genética total de la población bajo estudio se puede explicar en un 87,7% debido a diferencias dentro de los grupos, mientras que un 12,3% se debió a la varianza entre los grupos. El análisis de subestructuración genética fue significativo ( $F_{st} = 0,12292$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando diferenciación genética entre las poblaciones de *P. infestans* del suroeste colombiano procedentes de diferentes hospedantes (Tabla 2).

## Discusión

En este trabajo se evaluó el nivel de variabilidad genética de una población de 26 aislamientos de *P. infestans* obtenida de cultivos de papa y tomate de árbol de diferentes municipios altoandinos del departamento de Nariño, utilizando la técnica molecular AFLP. Los resultados indicaron la diferenciación de la población en base a su hospedante de origen y la presencia de un bajo nivel de variación en cada uno de los grupos generados.

Tradicionalmente, las poblaciones de *P. infestans* han sido evaluadas mediante la utilización de un conjunto de marcadores fenotípicos y genotípicos que incluyen la evaluación de patrones fisiológicos, tipo de apareamiento, resistencia a fungicidas fenilamidas, patrones isoenzimáticos (*Gpi* y *Pep*), perfil de RFLP (con la sonda RG57) y definición de haplotipos mitocondriales [10,11,13,14]. Dichas metodologías han conducido a la definición de la estructura poblacional de *P. infestans* a partir de linajes genéticos. Así, por ejemplo, el linaje US-1 se asocia con la población A1, derivada de las primeras migraciones globales del patógeno desde la región central de México, que actualmente está siendo desplazada por nuevas variantes. El linaje EC-1 es característico de los aislamientos que afectan a la papa en los Andes Suramericanos [3,7,15]. Este esquema de análisis de subestructuración poblacional

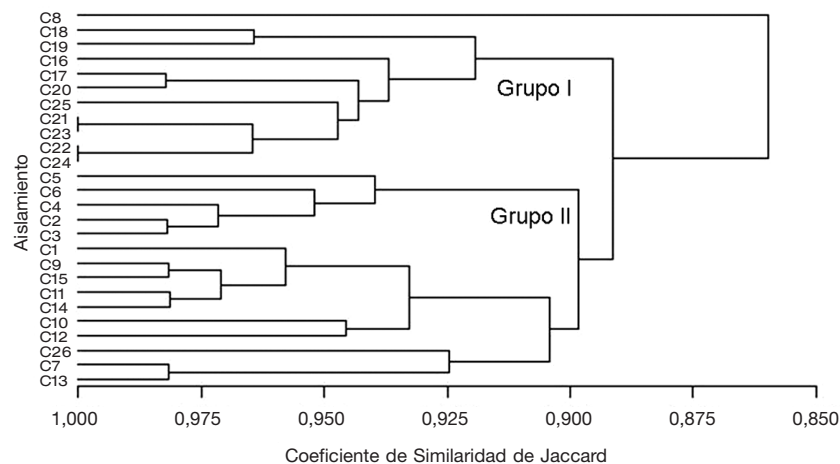


Figura. Dendrograma (UPGMA) generado a partir del análisis de 26 aislamientos de *Phytophthora infestans* del suroeste de Colombia con cinco pares de cebadores AFLP.

**Tabla 2.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) para el análisis AFLP de 26 aislamientos de *Phytophthora infestans* recogidos de papa (*S. tuberosum* y *S. phureja*) y tomate de árbol (*S. betaceum*) en el suroeste de Colombia.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	2	1,718	0,06195 Va	12,29
Dentro de poblaciones	23	10,167	0,44204 Vb	87,71
Total	25	11,885	0,50398	
FST:	0,12292			

ha venido siendo reevaluado, debido a que no permite inferir diferencias dentro de cada linaje, por lo que se ha propuesto la utilización de pruebas con marcadores moleculares neutros para el hallazgo de posibles diferencias [5]. En *P. infestans*, estos estudios han empleado básicamente marcadores RAPD [2,22], microsatélites [16] y AFLP [3,6,16], que recientemente se han incorporado en los estudios realizados por nuestro grupo en Colombia, tal como se desprende del presente trabajo y del desarrollado por Amaya y Raigosa (2006) [4]. En este último, se encontró que la población del patógeno que afecta a los cultivos de papa en Antioquia y Nariño era, fundamentalmente, clonal y estaba asociada al linaje EC-1, mientras que aquellos aislamientos que afectaban al tomate de árbol pertenecían al linaje EC-3. Sin embargo, el análisis de RAPD permitió detectar un cierto grado de variación dentro de dichos linajes, separando en dos grupos los aislamientos de papa y de tomate de árbol. Se generó, también, un tercer grupo que incluyó aislamientos de ambos linajes. Esta situación condujo al planteamiento de esta investigación, empleando, únicamente, la población del departamento de Nariño y marcadores AFLP, más reproducibles y con mayor capacidad de diferenciación genética que los RAPD [23].

Inicialmente, los resultados encontrados con respecto a los niveles de variación de la población de *P. infestans* que afecta los cultivos de solanáceas en el departamento de Nariño confirmaron la condición predominantemente clonal de esta población, aunque nuevamente se detectó cierto grado de variación entre los individuos. Esta situación está en concordancia con los estudios de la biología del patógeno en dicha zona, donde se ha encontrado únicamente la presencia del tipo de apareamiento A1 y una fuerte presión de selección por el frecuente uso de fungicidas sistémicos, que impiden el desarrollo de nuevas variantes insensibles a éstas moléculas químicas, a partir de mecanismos genéticos como la parasexualidad [15,17]. Este escenario es contrario a lo encontrado en algunos países de Europa, donde la presencia de ambos tipos de apareamiento han posibilitado la reproducción sexual y, por ende, la generación continua de nuevas variantes, algunas de las cuales, al resultar insensibles a diferentes fungicidas sistémicos y presentar mayores grados de agresividad sobre sus hospedantes, han desplazado a las poblaciones antiguas de dichas regiones [6,7,16]. Un ejemplo de tales diferencias se evidencia en el estudio de diversidad genotípica y fenotípica realizado con 500 aislamientos de *P. infestans* procedentes de 80 regiones cultivadoras de papa de Escocia donde, entre otras variables, se estudió la diversidad de los aislamientos mediante AFLP, encontrando un alto nivel de variación genética representado por los índices de Nei y Shannon, de 0,39 y 0,57, respectivamente [6].

En la actualidad, una de las poblaciones de *P. infestans* mejor estudiadas del mundo corresponde a aquella que se presenta en la zona altoandina de Ecuador [1,3,8,19-21]. La proximidad geográfica que presenta el departamento de Nariño con Ecuador, necesariamente conduce a realizar comparaciones con lo encontrado en dicho país. Allí se ha registrado la presencia de cuatro linajes genéticos de *P. infestans*: EC-1 (papa y especies silvestres tuberíferas de *Solanum*), EC-2 (*Solanum brevifolium* y *Solanum tetrapetalum*), US-1 (tomate, pepino de agua y *Solanum caripense*) y EC-3 (tomate de árbol) y de aislamientos con tipo de apareamiento A1 y, minoritariamente, A2 [3,8,19-21]. Además, en un análisis con marcadores AFLP de las poblaciones de diferentes hospedantes fue posible diferenciar los aislamientos de acuerdo a su linaje genético, presentándose dos grandes grupos: uno conformado por aislamientos asociados a los linajes US-1 y EC-1 y el otro que incluyó aislamientos de tomate de árbol (EC-3) y del complejo *Anarrhichomenum* (EC-2) [3]. Dentro de cada grupo se detectó variación genética entre los aislamientos, aunque dicho nivel fue mayor entre aquellos obtenidos en papa que en los procedentes de tomate de árbol. Esta situación fue muy similar a la encontrada en el presente estudio, pues el dendrograma UPGMA generado y el posterior análisis de varianza molecular permitió la separación de los aislamientos en función de su hospedante, y el nivel de similitud encontrado dentro de los grupos generados fue muy alto (>0,90). De especial interés resultó la presencia de un aislamiento obtenido en papa (C8) que presentó patrones electroforéticos muy diferentes a los que definieron los dos grupos principales encontrados en el estudio; situación que merece ser estudiada a fondo mediante análisis de secuencias de regiones ribosomales y análisis de haplotipos mitocondriales, para definir claramente su identidad taxonómica y/o posible linaje genético.

Se espera que la información derivada de esta investigación sirva de base para el planteamiento de trabajos epidemiológicos que permitan evaluar la aparente especificidad patógeno-hospedante que se presenta en la población de *P. infestans* del suroeste del país. Esto puede ser realizado a partir de estudios de patogenicidad cruzada en laboratorio, invernadero y campo. Dichos resultados permitirían ajustar las estrategias de control de la enfermedad en las regiones donde se traslapan los cultivos de solanáceas susceptibles a *P. infestans*.

*Esta investigación se realizó gracias a la colaboración del personal de los Laboratorios de Estudios Moleculares y Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. La financiación del estudio se realizó con recursos de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia (Proyecto Quipú 20101005571) y de la Universidad de Nariño.*

## Bibliografía

1. Abad ZG, Abad JA, Ochoa C. Historical and scientific evidence that supports the modern theory of the Peruvian Andes as the centre of origin of *Phytophthora infestans*. En: Dowley LJ, Annon E, Cooke RL, Keane T, O'Sullivan E (Eds). *Phytophthora infestans* 150. Dublin, Boole Press 1995: 239-246.
2. Abu-El Samen FM, Secor GA, Gudmestad NC. Variability in virulence among asexual progenies of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Phytopathology* 2003; 93: 293-304.
3. Adler NF, Erselius LJ, Chacón MG, Flier WG, Ordóñez ME, Kroon LPNM, Forbes GA. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology* 2004; 94: 154-162.
4. Amaya MC, Raigosa GN. Análisis de la variabilidad genética de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* utilizando marcadores moleculares. Tesis Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, 2006.
5. Cooke DEL, Lees AK. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathol* 2004; 53: 692-704.
6. Cooke DEL, Young V, Birch PRJ, Toth R, Gourlay F, Day JP, Carnegie SF, Duncan JM. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). *Plant Pathol* 2003; 52: 181-192.
7. Day JP, Shattock RC. Aggressiveness and other factors relating to displacement of populations of *Phytophthora infestans* in England and Wales. *Eur J Plant Pathol* 1997; 103: 379-391.
8. Forbes GA, Escobar XC, Ayala CC, Revelo J, Ordóñez ME, Fry BA, Doucett K, Fry WE. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* 1997; 87: 811-818.
9. Fry WE, Goodwin SB. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience* 1995; 47: 363-371.
10. Fry WE, Goodwin SB, Dyer AT, Matuszak JM, Drenth A, Tooley PW, Sujkowski LS, Koh YJ, Cohen BA, Spielman LJ, Deahl KL, Inglis DA, Sandian KP. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Dis* 1993; 77: 653-661.
11. Goodwin SB. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 1997; 87: 462-473.
12. Goodwin SB, Cohen BA, Fry WE. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91: 11591-11595.
13. Goodwin SB, Drenth A, Fry WE. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr Genet* 1992; 22: 107-115.
14. Griffith GW, Shaw DS. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Appl Environ Microbiol* 1998; 10: 4007-4014.
15. Jaramillo S. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, 2004: 137p.
16. Knapova G, Gisi U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathol* 2002; 51: 641-653.
17. Lagos LE. 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 Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias, 2002: 66p.
18. Mahuku G, Peters RD, Platt HW, Daayf F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994 to 1996. *Plant Pathol* 2000; 49: 252-260.
19. Oliva RF, Erselius LJ, Adler NE, Forbes GA. Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador. *Plant Pathol* 2002; 51: 710-719.
20. Ordoñez ME, Hohl HR, Velasco A, Ramon MP, Oyarzun PJ, Smart CD, Fry WE, Forbes GA, Erselius LJ. A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans*, attacks wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology* 2000; 88: 265-271.
21. Oyarzun PJ, Pozo A, Ordoñez ME, Doucett K, Forbes GA. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology* 1998; 88: 265-271.
22. Páez O, Valverde R, Gómez L, Brenes A. Diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en plantaciones de papa en Costa Rica con el uso de RAPDs. *Agron Costar* 2005; 29: 41-55.
23. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 4407-4414.
24. Weir BS, Hill WG. Estimating F-statistics. *Annu Rev Genet* 2002; 36: 721-750.