

Variabilidad genética de *Phytophthora infestans sensu lato* mediante uso de microsatélites en el sur colombiano

Genetic variability of *Phytophthora infestans sensu lato* using microsatellite in southern Colombia

Tharling Yadhannia Hernández-Díaz^{1*}, Edison Martínez P.¹,
Claudia Elizabeth Salazar G.², Luz Estela Lagos Mora¹

¹ Grupo de Investigación Genética y Evolución de Organismos Tropicales, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

² Grupo de Investigación en Sanidad Vegetal, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia

Recibido: Agosto 10 de 2024

Aceptado: Noviembre 23 de 2024

*Correspondencia del autor: Tharling Yadhannia Hernández-Díaz

E-mail: tharling.bio@udenar.edu.co

<https://doi.org/10.47499/revistaacsb.v1i36.314>

Resumen

Introducción. *Phytophthora infestans sensu lato* es el fitopatógeno causante del tizón tardío en solanáceas, con impactos ambientales, económicos y de seguridad alimentaria. Presenta alta incidencia de la enfermedad y cambios genéticos acelerados. **Objetivo.** Evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de *P. infestans sensu lato* aisladas de solanáceas en municipios del sur de Colombia. **Materiales y métodos.** Se obtuvieron 40 aislamientos de *P. infestans sensu lato* de cuatro hospederos de solanáceas provenientes de municipios de Nariño y Putumayo. Se extrajo el ADN y se amplificó con cinco marcadores microsatélites. Las bandas se visualizaron en geles de agarosa al 3% y se midieron con ImageJ. El análisis de datos se realizó con el paquete Poppr y el software STRUCTURE. **Resultados.** Se obtuvo alto polimorfismo con la amplificación de más de cuatro alelos por locus, presencia de triploidia y elevada diversidad genética con 40 genotipos multilocus únicos, en comparación con otras regiones del país. Las poblaciones se estructuraron de acuerdo a su hospedero con una diferenciación genética (G_{st}) entre 0.39 y 0.73, probablemente por la preferencia de hospedero y el uso de hospederos alternativos. El análisis de desequilibrio de ligamiento sugiere posible reproducción sexual en poblaciones *P. infestans* obtenidas de papa y *P. betacei* de tomate de árbol. **Conclusión.** El análisis con cinco marcadores microsatélites permitió identificar alto nivel de polimorfismo en las poblaciones de *P. infestans sensu lato* y alta variabilidad intrapoblacional para el sur de Colombia, así como estructura de las poblaciones de acuerdo a su hospedero.

Palabras clave: Oomicetos, Genotipos multilocus, SSR, Diversidad genética, Solanáceas.

Abstract

Introduction. *Phytophthora infestans sensu lato* is the phytopathogen causing late blight in solanaceae, with environmental, economic and food safety impacts. It presents high disease incidence and accelerated genetic changes. **Objective.** To evaluate the genetic variability of populations of *P. infestans sensu lato* isolated from solanaceae in municipalities of southern Colombia. **Materials and methods.** Forty isolates of *P. infestans sensu lato* were obtained from four solanaceous hosts from municipalities of Nariño and Putumayo. DNA was extracted and amplified with five microsatellite markers. The bands were visualized on 3% agarose gels and measured with ImageJ. Data analysis was performed with the Poppr package and STRUCTURE software. **Results.** High polymorphism was obtained with amplification of more than four alleles per locus, presence of triploidy and high genetic diversity with 40 unique multilocus genotypes, compared to other regions of the country. Populations were structured according to their host with a genetic differentiation (Gst) between 0.39 and 0.73, probably due to host preference and the use of alternative hosts. Linkage disequilibrium analysis suggests possible sexual reproduction in *P. infestans* populations obtained from potato and *P. betacei* from tree tomato. **Conclusion.** The analysis with five microsatellite markers identified a high level of polymorphism in *P. infestans sensu lato* populations and high intrapopulation variability for southern Colombia, as well as population structure according to host.

Keywords: Oomycetes, Multilocus genotypes, SSR, Genetic diversity, Solanaceae.

Introducción

Phytophthora infestans es un oomiceto fitopatógeno heterotálico que provoca una de las enfermedades más importantes a nivel mundial conocida como gota o tizón tardío, ya que representa la pérdida de 7200 millones de dólares anuales aproximadamente (1). Este patógeno ataca a las especies de la familia solanácea cultivadas como papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), pepino dulce (*Solanum muricatum*) y algunas especies silvestres (2). En cambio, el tizón tardío en tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es provocado por *P. betacei* descrito en Colombia (3), mientras en Ecuador y Perú se describe a *Phytophthora andina* como la responsable de esta enfermedad en este hospedero (4), sin embargo, es un tema que aún sigue en discusión.

Especies dentro de *P. infestans sensu lato* (*P. infestans* y *P. betacei*) presentan alta incidencia de la enfermedad y cambios genéticos acelerados en sus poblaciones, dados principalmente por mecanismos como mutación, recombinación, parasexualidad, recombinación mitótica, selección y migración de nuevos genotipos (5). La aparición de cepas resistentes a fungicidas y la presencia de reproducción sexual constituyen ejemplos claros del cambio en dichas poblaciones, lo cual permite el establecimiento de genotipos más agresivos y con mayor éxito reproductivo (6), por lo que se hace necesaria la investigación de los aspectos básicos de la biología, epidemiología y genética del patógeno. Estos cambios poblacionales se han estudiado con diferentes marcadores

res tanto genotípicos como fenotípicos y a través de los años su enfoque se ha trasladado hacia la variabilidad inter e intraespecífica y entre cepas individuales donde se requieren marcadores moleculares completamente caracterizados (7). Uno de los más utilizados son los marcadores de repetición de secuencia simple o microsatélites (SSR) que han proporcionado información útil sobre los niveles de diversidad genética, estructura de la población, dinámica de la enfermedad, estudios evolutivos y rastreo de la migración del patógeno (7).

En los departamentos de Nariño y Putumayo, Chaves et al. (8) por medio de análisis de SSR reportó un alto porcentaje de variabilidad genética dentro de las poblaciones de *P. infestans* y *P. betacei* entre 2008 y 2016. Además, en estos departamentos se reportan los primeros aislamientos de *P. betacei* en tomate de árbol (*S. betaceum*), a partir de lo cual Mideros et al. (3) sugieren una especiación ecológica en alopatria debido a los altos niveles de especialización de hospederos. Esto demuestra claramente que las poblaciones del patógeno presentan alta variabilidad genética a pesar de que el tipo de apareamiento reportado en Colombia es A1, sin embargo, se debe tener en cuenta los antecedentes del tipo de apareamiento A2 reportados en Ecuador (9). Debido a que puede existir un flujo natural sin control de productos agrícolas de solanáceas en la frontera colombo-ecuatoriana que desemboque en la reproducción sexual del patógeno, produciendo mayor variabilidad genética representada en genotipos más agresivos y con mayor tolerancia a fungicidas que pueden ocasionar epidemias.

Por lo tanto, es necesario el monitoreo continuo de las poblaciones del patógeno en Nariño y Putumayo, para la obtención de nuevos enfoques que puedan ser útiles para el desarrollo de estrategias eficientes en el manejo del tizón tardío, por medio del conocimiento de la estructura poblacional de los patógenos *P. infestans* y *P. betacei*. Por lo cual, el objetivo de la investigación fue evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de *P. infestans sensu lato* aisladas de solanáceas en municipios del sur de Colombia.

Materiales y métodos

Aspectos éticos

Los muestreos se realizaron bajo las condiciones del permiso marco de recolección de especímenes de es-

pecies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial de acuerdo con el Decreto 1376 del 2013 de la República de Colombia.

Obtención de aislamientos

Los aislamientos de *P. infestans* y *P. betacei* se obtuvieron del cepario del grupo de investigación de Genética y evolución de organismos tropicales (GENPAT) de la Universidad de Nariño, colectados entre los años 2019 y 2022 y con muestreos en los municipios de Imués, San José de Alban, Pasto, Taminango, San Lorenzo y Sibundoy (Figura 1), hasta completar 10 aislamientos del patógeno por cada hospedero.

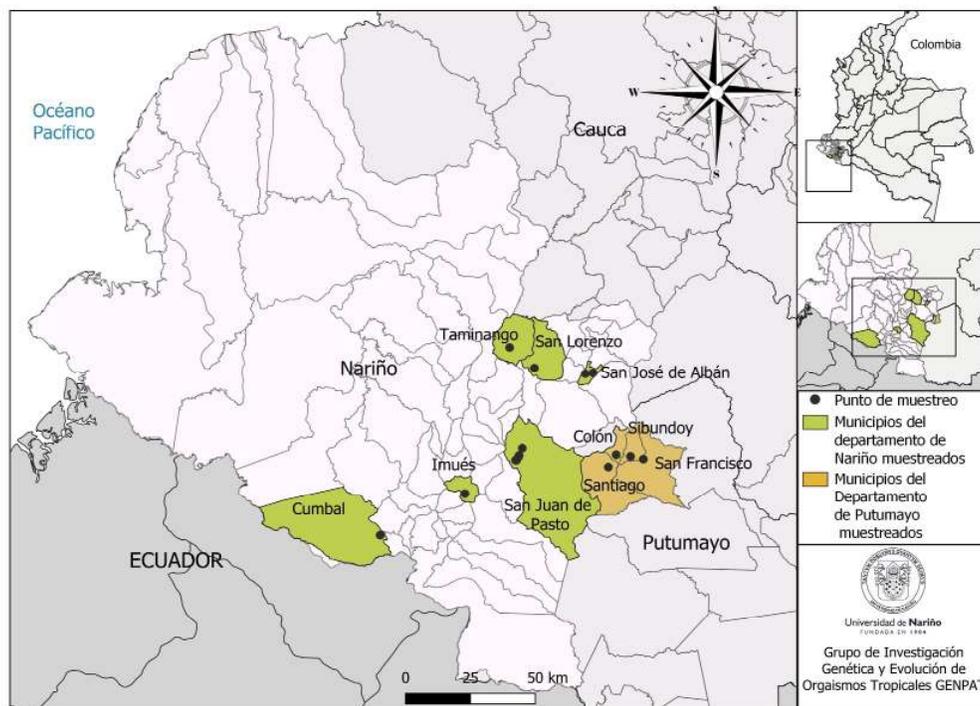


Figura 1. Mapa de municipios en Nariño y Putumayo de donde provienen los aislamientos de *P. infestans sensu lato*.

En cada zona de muestreo, se visitaron cultivos y huertas de papa, tomate de árbol, tomate y pepino dulce, donde se colectaron hojas y tallos con lesiones individuales en los que se observaron los síntomas característicos de la enfermedad causada por estos patógenos. El transporte de las muestras hasta el laboratorio de la Universidad de Nariño se realizó en bolsas debidamente marcadas en una nevera de poliestireno expandido para mantener una temperatura constante hasta el momento de ser procesadas. Cada muestreo se realizó en época de lluvia, evidenciando la presencia del patógeno o enfermedad.

A partir de las muestras obtenidas en campo, se tomó de 0.5 a 1 cm² de cada lesión con tejido necrótico y sano, los trozos se desinfectaron con etanol al 70% durante 25 s, seguido de hipoclorito de sodio al 1.25% por 15 s y agua destilada estéril; posteriormente, se secaron con papel toalla estéril (10), para sembrarse en diferentes medios de cultivo de agar: tomate-arveja, arveja y centeno, suplementados con rifampicina para evitar el crecimiento de bacterias. Los inóculos se mantuvieron a temperatura ambiente durante ocho días y se confirmó su identificación por medio de la observación microscópica y macroscópica (11). Finalmente, para mantener la homogeneidad genética de cada aislamiento se obtuvieron cultivos monospóricos (3).

Extracción de ADN

Los aislamientos se sembraron en medio tomate arveja a temperatura ambiente en oscuridad por 20 días, el micelio fue macerado hasta obtener un polvo fino utilizando nitrógeno líquido. El ADN genómico se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Griffith & Shaw (12).

Revisión y selección de marcadores microsatélites

A partir de la revisión bibliográfica se eligió un conjunto de cinco marcadores microsatélites (Tabla 1) completamente caracterizados en *P. infestans* (13), reportados como polimórficos e informativos en investigaciones anteriores y que permitan detectar la presencia de poliploidías en las muestras (8).

Tabla 1. Secuencia de marcadores microsatélites para *Phytophthora infestans*.

Nombre	Tamaño de producto (pb)	Forward	Reverse
Pi63	265 - 280	ATGACGAAGATGAAAGTGAGG	CGTATTTTCCTGTTTATCTAACACC
Pi70	185 - 205	ATGAAAATACGTCAATGCTCG	CGTTGGATATTTCTATTTCTTCG
PinfSSR4	280 - 305	TCTTGTTTCGAGTATGCGACG	GTTTCACTTCGGGAGAAAGGCTTC
PinfSSR6	230 - 250	GTTTTGGTGGGGCTGAAGTTTT	TCGCCACAAGATTTATTCGG
PinfSSR11	325 - 360	TTAAGCCACGACATGAGCTG	GTTTAGACAATTGTTTTGTGGTCGC

Amplificación de ADN de la región SSR

Se amplificaron las regiones SSR mediante PCR con las siguientes concentraciones finales recomendadas por el fabricante (Promega): 1X Colorless GoTaq® Reaction Buffer, 0.2 mM dNTPs, 1.25 U GoTaq® DNA Polymerase, 1 mM MgCl₂, 0.5 μM de primers forward y reverse y 10 ng/μL de ADN molde. Usando las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 20 s, 58°C por 90 s, 72°C por 60 s y una extensión final a 72°C durante 20 minutos (13).

Para determinar el tamaño de los alelos en pares de bases (pb) se prepararon geles de agarosa al 3% a 85V y 400 mAh durante 4h 30min, con el marcador de peso molecular ExcelBand™ 50bp (SMOBIO). Se realizaron mínimo dos corridas en gel de agarosa a todas las muestras para confirmar el rango de amplificación, la medición de las bandas se realizó por triplicado en el software ImageJ.

Análisis estadístico

Para el análisis de datos de microsatélites, las poblaciones se definieron de acuerdo a su hospedero y en algunos casos por su ubicación geográfica usando el paquete de R “Poppr” 1.0.5 (14), donde se estimó: frecuencias alélicas de cada locus, genotipos multilocus (GML), diversidad genética de Nei, índices de diversidad: Shannon-Wiener, Stoddart y Taylor y Simpson; diferenciación genética (Gst) (15), porcentaje de loci polimórficos, alelos únicos, análisis de varianza molecular (AMOVA) y desequilibrio de ligamiento. La estructura poblacional se evaluó por medio de un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) y el software STRUCTURE 2.3.4 (16).

Resultados

Los loci Pi63 y Pi70 fueron diploides en *P. infestans*, al igual que todos los loci en *P. betacei*. Los marcadores SSR6, SSR11 y SSR4, en cambio, mostraron evidencia de triploidía en aislamientos procedentes de *S. muricatum* y *S. tuberosum* (*P. infestans*). Adicionalmente, las bandas obtenidas estuvieron dentro del rango de amplificación reportado para cada microsatélite y fueron polimórficos en su totalidad, presentando entre 12 y 24 alelos por locus.

Caracterización genética de poblaciones de *Phytophthora infestans sensu lato*

Para *P. infestans*, el locus SSR11 fue el más polimórfico con 17 y 11 alelos en aislamientos obtenidos de *S. tuberosum* y *S. lycopersicum* respectivamente, mientras que para *S. muricatum* fue el locus SSR4 con 10 alelos. Los loci menos polimórficos de acuerdo con el hospedero del patógeno fueron SSR6 y Pi63 en *S. tuberosum* con 4 alelos, Pi70 con 6 alelos en *S. muricatum* y SSR4 con 5 alelos en *S. lycopersicum* (Tabla 2).

Los aislamientos obtenidos de *P. betacei* correspondieron a un solo hospedero (*S. betaceum*). Los loci con mayor polimorfismo fueron SSR6 y SSR4 en igual medida con 9 alelos, seguidos por SSR11 y Pi63 con 6 alelos y Pi70

como el locus menos polimórfico (4 alelos) en comparación con los demás microsatélites evaluados (Tabla 2). En muestras de *P. betacei*, se observó que algunos alelos se encontraron en esta población y no son compartidos con las poblaciones de *P. infestans*, especialmente en los loci SSR6, Pi63, SSR4 y Pi70. El locus SSR11, por su parte, compartió todos sus alelos con *P. infestans* en al menos un hospedero. La mayoría de alelos de *P. infestans sensu lato* presentaron frecuencias menores a 50%, indicando alta riqueza y diversidad alélica.

Tabla 2. Resumen de datos por locus en aislados de *P. infestans* y *P. betacei* de acuerdo a su hospedero.

Locus	<i>P. infestans</i>						<i>P. betacei</i>					
	<i>S. tuberosum</i>			<i>S. muricatum</i>			<i>S. lycopersicum</i>			<i>S. betaceum</i>		
	Alelos	1-D	Hexp	Alelos	1-D	Hexp	Alelos	1-D	Hexp	Alelos	1-D	Hexp
SSR6	4	0.70	0.74	8	0.83	0.87	7	0.79	0.83	9	0.86	0.91
SSR11	17	0.93	0.96	9	0.83	0.87	11	0.88	0.93	6	0.80	0.84
Pi63	4	0.48	0.51	7	0.82	0.86	8	0.84	0.89	6	0.80	0.84
SSR4	8	0.82	0.86	10	0.85	0.89	5	0.76	0.80	9	0.86	0.91
Pi70	6	0.70	0.74	6	0.80	0.84	7	0.82	0.86	4	0.64	0.67
mean	7.8	0.73	0.76	8	0.83	0.87	7.6	0.82	0.86	6.8	0.79	0.83

Nota. Alelos = número de alelos observados en cada locus, 1-D = índice de diversidad de Simpson, Hexp = índice de diversidad de Nei.

Variabilidad genética intra e interpoblacional de *P. infestans* y *P. betacei*.

Se observó 30 genotipos multilocus (GML) en los 30 aislamientos de *P. infestans* con los cinco loci seleccionados, los cuales se dividen en 10 GML correspondientes a cada hospedero. De la misma forma, los 10 aislamientos obtenidos de *P. betacei* se agruparon en 10 GML aislados de *S. betaceum*. Los índices de Shannon-Wiener, Stoddart y Taylor, Simpson, y la uniformidad presentaron los mismos valores en todos los casos (2.3, 10, 0.9 y 1 respectivamente) y la diversidad genética de Nei estuvo entre 0.76 y 0.866, indicando alta diversidad genética para *P. infestans* y *P. betacei* de acuerdo a su hospedero.

La diferenciación genética de *P. infestans* calculada por G_{st} de acuerdo con el hospedero presentó valores de 0.39 entre papa y pepino, 0.56 entre pepino y tomate y 0.73 entre papa y tomate. El análisis de acuerdo con la región geográfica indicó que la diferenciación entre aislamientos de Nariño y alto Putumayo en esta especie fue de 0.55, mientras que en *P. betacei* fue de 0.24 entre estas dos regiones. El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó rechazo de la hipótesis nula, por lo tanto, los resultados sugieren la diferencia estadística entre las poblaciones de *P. infestans* determinadas por su hospedero (Tabla 3). De acuerdo a su origen geográfico se evidenció 8.68% de varianza entre las regiones de Nariño y alto Putumayo. Sin embargo, el mayor porcentaje de variación genética se presentó entre aislamientos dentro de estos niveles (>89%, $p < 0.001$). En el caso de *P. betacei*, se observó que las poblaciones no se diferencian significativamente ($p = 0.65$) según su origen geográfico (0%) y la variación genética se encontró entre las muestras aisladas de *S. betaceum* (100%).

Tabla 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de aislados de *P. infestans* entre y dentro de sus hospederos.

		Df	SSD	MSD	Sigma	Total (%)	Valor P
Pepino-Tomate	Entre hospederos	1	4.783	4.783	0.217	7.684	0.003
	Dentro de hospederos	18	46.989	2.610	2.610	92.316	0.003
	Total	19	51.772	2.725	2.828	100	
Pepino-papa	Entre hospederos	1	3.650	3.650	0.198	10.602	0.001
	Dentro de hospederos	18	30.056	1.670	1.670	89.398	0.001
	Total	19	33.706	1.774	1.868	100	
Papa-Tomate	Entre hospederos	1	6.236	6.236	0.362	12.164	0.001
	Dentro de hospederos	18	47.067	2.615	2.615	87.836	0.001
	Total	19	53.303	2.805	2.977	100	

Nota. Df = grados de libertad, SSD = suma de diferencias de cuadrados, MSD = desviación cuadrática media.

La estructura poblacional de los aislamientos fue descrita usando un análisis discriminante de componentes principales (DAPC), que separa a los aislamientos en cuatro grupos completamente definidos según su hospedero. Las poblaciones de papa, tomate y pepino se diferencian claramente entre sí. Por otra parte, los aislamientos de *P. betacei* y *P. infestans* aislados de pepino presentaron mayor cercanía (Figura 2).

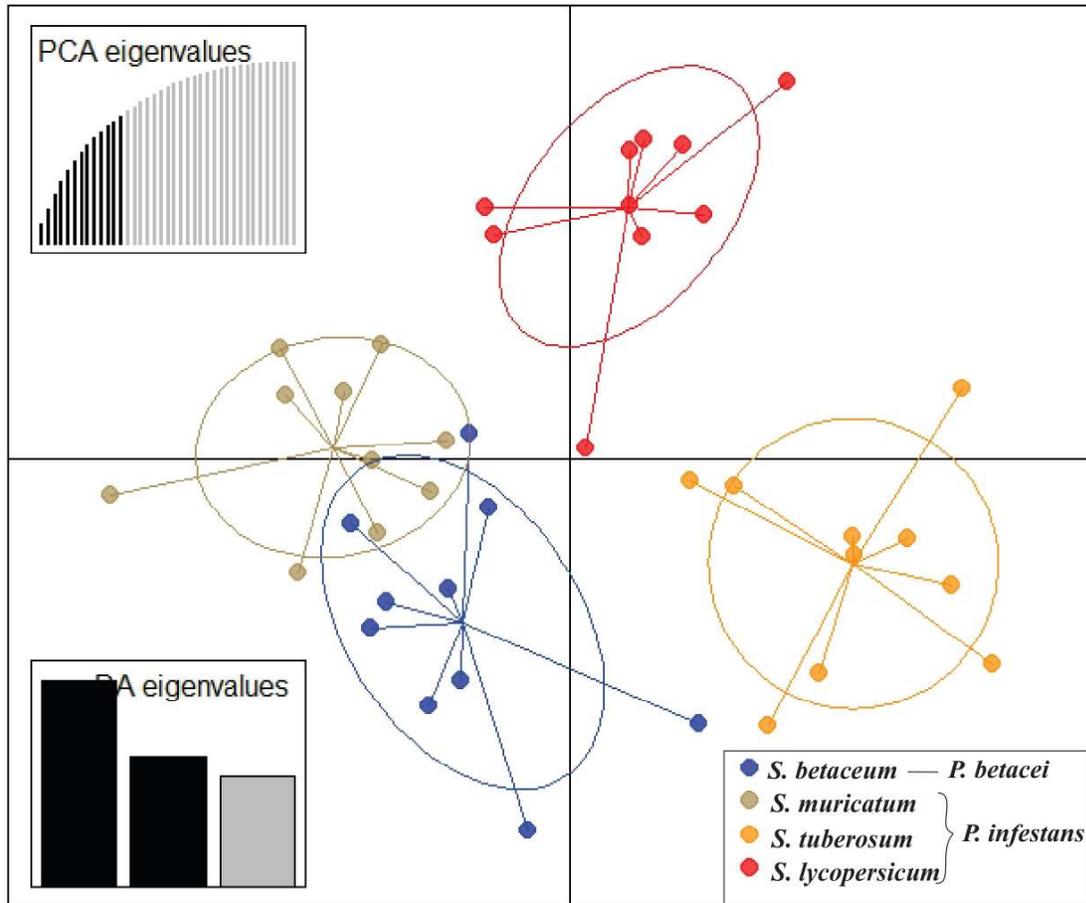


Figura 2. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) detectado para el análisis de microsatélites de *P. betacei* y *P. infestans* de acuerdo a su hospedero. Cada aislamiento está representado por un punto y las poblaciones como elipses.

En la figura 3 se presenta la estructura genética de las poblaciones de acuerdo a la probabilidad de que un aislamiento pertenezca a cada población definida por su hospedero. Se observó que en general todos los aislamientos de *P. infestans* y *P. betacei* se agrupan correctamente, especialmente las cepas de *S. tuberosum*, donde su probabilidad es mayor al 90%. Sin embargo, algunos aislamientos muestran relación con otro hospedero (Figura 3A). Se obtuvo resultados similares mediante el análisis en el software STRUCTURE (Figura 3B), el cual determinó que el número de grupos óptimos en el que se ajustan los aislamientos es 4 (Figura 3C), correspondientes a los hospederos analizados en este estudio.

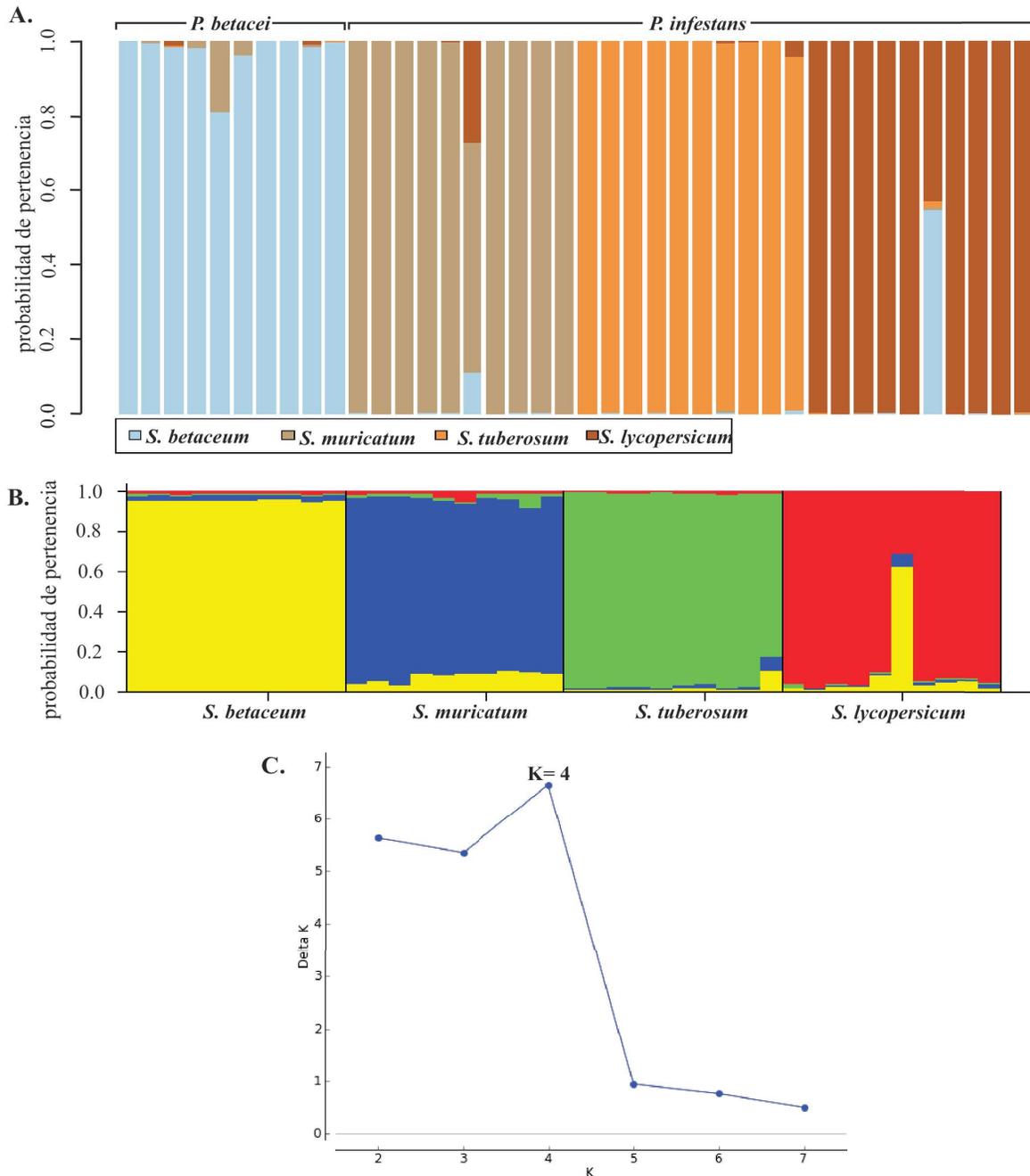


Figura 3. A. Estructura genética de *P. betacei* y *P. infestans* de acuerdo a su hospedero en poppr. B. Agrupación de los aislamientos de *P. infestans* y *P. betacei* mediante el software STRUCTURE. C. Delta K para determinar el número óptimo de agrupaciones de los aislamientos (K=4).

Se realizó un DAPC teniendo en cuenta el hospedero y el origen geográfico de los aislamientos (Figura 4). Las poblaciones de *P. betacei* aisladas de *S. betaceum* tanto de Nariño como de Putumayo se siguen agrupando en un solo conglomerado, mientras que las poblaciones de *P. infestans* no presentan una estructura definida, a excepción de los aislamientos obtenidos de *S. tuberosum*, los cuales se mantienen en un solo grupo separado de los demás. De acuerdo a su origen geográfico, *P. infestans* obtenido de Putumayo (*S. lycopersicum* y *S. muricatum*) comparten aislamientos parcialmente, en tanto que, las cepas de Nariño se observan en dos grupos totalmente separados.

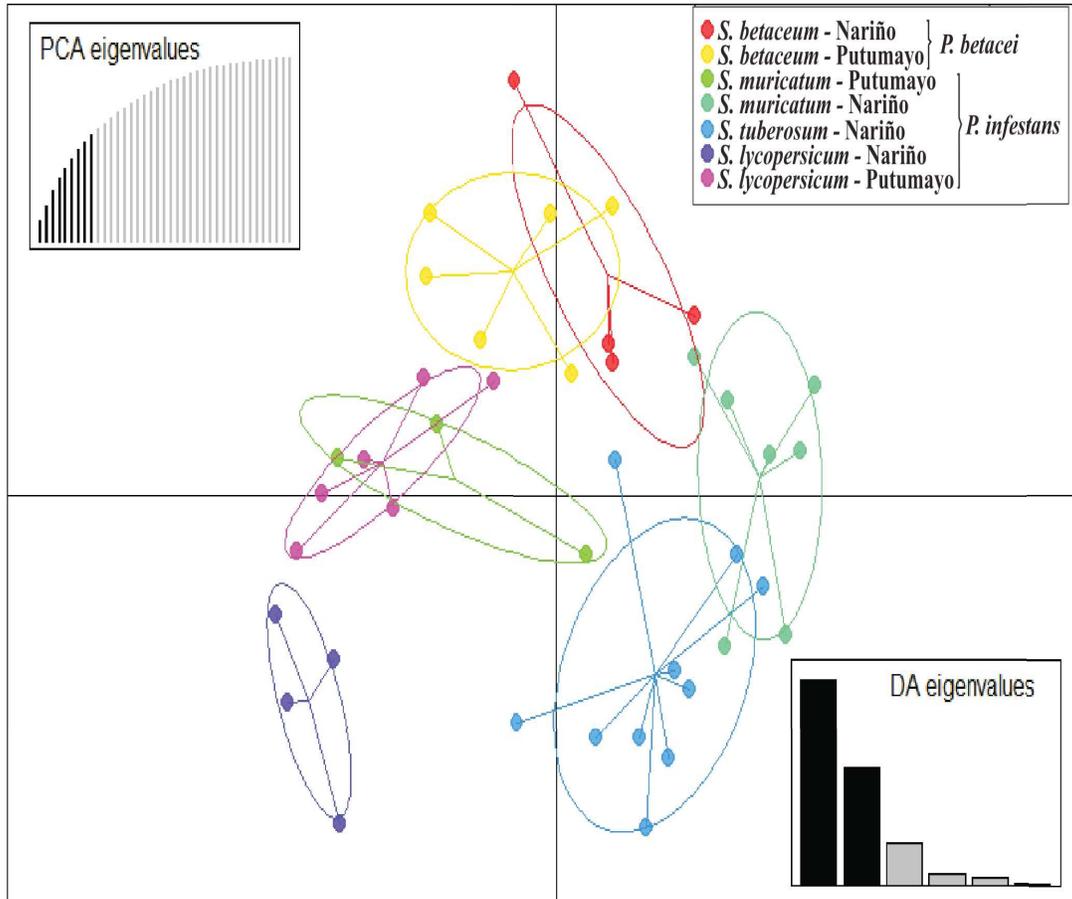


Figura 4. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) detectado para el análisis de microsatélites de *P. betacei* y *P. infestans* aisladas de Nariño y Putumayo. Cada aislamiento está representado por un punto y las poblaciones como elipses.

De acuerdo al análisis de desequilibrio de ligamiento con los cinco microsatélites, no se encontró evidencia de reproducción sexual en *P. infestans* obtenido de *S. lycopersicum* y *S. muricatum*, los datos corregidos y no corregidos por clones rechazaron la hipótesis nula, la cual plantea que los alelos observados en distintos loci no se encuentran vinculados si las poblaciones son sexuales (Figura 5). Sin embargo, en *P. infestans* aislados de *S. tuberosum* y *P. betacei* de *S. betaceum* no es posible rechazar esta hipótesis, lo que sugiere reproducción sexual en estas poblaciones (Figura 5C-D).

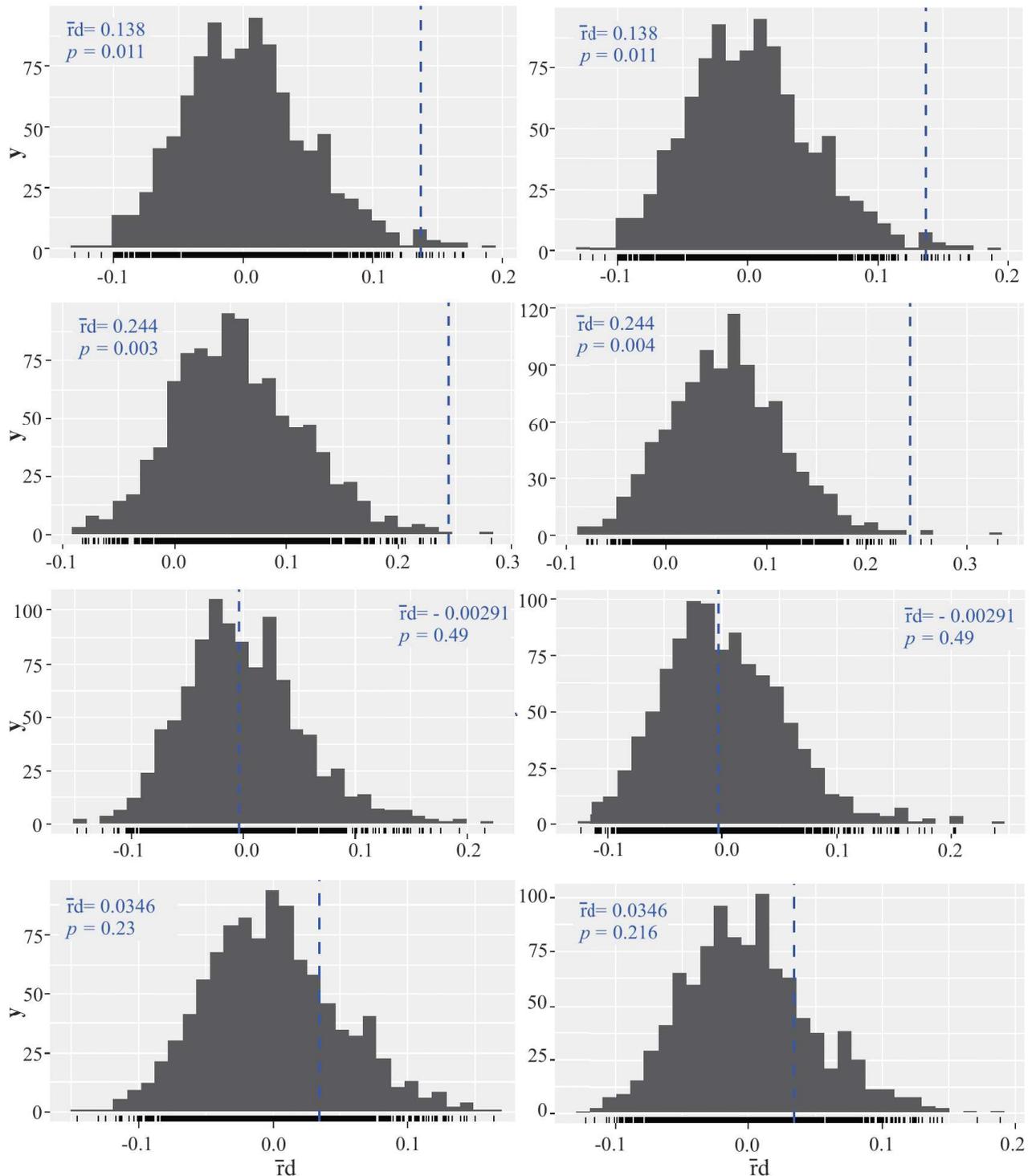


Figura 5. Índice de asociación estandarizado de poblaciones de *P. infestans* (A-C) y *P. betacei* (D) de acuerdo a su hospedero: A. *S. lycopersicum*, B. *S. muricatum*, C. *S. tuberosum* y D. *S. betaceum*. Datos sin corrección (izquierda) y con corrección (derecha) de clones.

Discusión

Se realizó la caracterización genética por medio de cinco microsatélites de cepas de *P. infestans* asociadas a papa, tomate y pepino dulce y de *P. betacei* asociadas a tomate de árbol. En *P. infestans* se observó presencia de aislamientos tanto diploides como triploides, al igual que en poblaciones de Bangladesh (17), Estados Unidos (18) y Colombia (8). Estas diferencias en el nivel de ploidía influyen en el número de alelos por locus y son relevantes debido a que pueden mejorar la aptitud del patógeno por medio del aumento de la heterocigocidad, diversidad

y plasticidad adaptativa, además de estar relacionados con la resistencia a fungicidas en hongos y oomicetos (19,20,21).

Esta caracterización indicó alto polimorfismo genético con más de cuatro alelos por locus con frecuencias en su mayoría entre 0.1 y 0.6 tanto en *P. infestans* como en *P. betacei* según su hospedero. Es decir, se presenta elevada diversidad de alelos representados de manera uniforme, por lo que la totalidad de loci fueron altamente polimórficos e informativos, de la misma manera como reporta Dangi *et al.* (22) y Olave-Achury *et al.* (23), donde los microsatélites evaluados presentaron más de dos alelos por locus. Los aislamientos de *P. infestans* obtenidos de los tres hospederos presentaron coincidencias de varios alelos, sin embargo, también se observó alelos únicos. De la misma forma, los aislamientos de *P. betacei*, aunque compartieron varios alelos con *P. infestans*, presentaron algunos exclusivos de su población, que marcan diferencias entre los grupos, evidenciando alta variabilidad genética en las poblaciones.

El marcador SSR4 ha sido reportado como uno de los loci con mayor número de alelos seguido por SSR6 (24,25), que coincide con los resultados obtenidos. Sin embargo, también se han reportado a los marcadores Pi63 (2 o 3 alelos), Pi70 (1 o 2 alelos) y SSR11 (menos de 3 alelos) como los loci menos polimórficos (26). En contraste a los resultados de este trabajo, en donde, Pi70 y Pi63 presentaron alto polimorfismo al amplificar más de cuatro alelos por locus en ambas especies, a pesar de evidenciar la menor riqueza alélica en comparación con los demás loci analizados, por su parte, SSR11 indicó la presencia del mayor número de alelos en *P. infestans* y para *P. betacei* los loci SSR4 y SSR6.

La alta variabilidad encontrada podría estar dada por la presencia de poliploidía y aneuploidía reportada en el patógeno, además, los loci evaluados presentan una tasa de mutación alta al encontrarse en regiones no codificantes y con unidades de repetición largas, lo que genera polimorfismos en las regiones SSR e incremento en el número de alelos (21). Adicionalmente, Li (13) indica que los diferentes marcadores pueden presentar mayor o menor polimorfismo para diferentes regiones y poblaciones evaluadas. Lo que demuestra, que la diversidad alélica está en constante cambio según la dinámica de cada población y ha aumentado considerablemente en el sur del país en *P. infestans sensu lato*.

La elevada variabilidad alélica se ve representada de

igual manera en la alta diversidad genética calculada de acuerdo a los GML obtenidos, los cuales corresponden a la totalidad de muestras aisladas para ambas especies. De igual modo, Olave-Achury *et al.* (23), encontraron 50 GML en *P. infestans* obtenidos de papa y tomate en la región central de Colombia. En los departamentos de Nariño y Putumayo, Chaves *et al.* (8) reportan 31 GML para *P. infestans* y 7 GML para *P. betacei*, que coincide con los resultados obtenidos en esta investigación. Además, estos mismos autores indican que la diversidad genotípica es mayor en el sur de Colombia en comparación con la región central, donde se encontraron 15 GML para *P. infestans* y 3 GML para *P. betacei*. Uno de los factores que aumenta la variabilidad observada en los patógenos es la presión de selección a la que se someten con la aplicación constante de fungicidas (19) debido a que, las encuestas de muestreo demostraron que los hospederos ubicados tanto en cultivos como en huertas eran fumigados frecuentemente cada 8 a 10 días al observar la presencia de la enfermedad (Comunicación personal propietarios de cultivos y huertas, 2019 – 2022).

Los índices de Shannon-Wiener, Stoddart y Taylor, Simpson, uniformidad y la diversidad genética de Nei indicaron elevada diversidad de GML de acuerdo al hospedero, lo cual puede generarse por distintos factores como el flujo de genes, recombinación sexual, parasexualidad, recombinación mitótica y mutación (1). Sin embargo, en Colombia solo existe un reporte del tipo de apareamiento A2 de *P. infestans* (27), existiendo bajas posibilidades de reproducción sexual en el patógeno. De esta manera, los mecanismos de recombinación asexual y mutación han sido los propuestos para explicar los cambios genéticos de las poblaciones en el oomiceto y su diversidad en Colombia (8,20). Cabe destacar que la variación detectada en una población también depende de los marcadores usados, la alta tasa de mutación de los microsatélites los convierte en marcadores genéticos poblacionales interesantes, debido a que identifican polimorfismos adicionales para una diferenciación más amplia en los aislamientos de *Phytophthora*, aunque estos pertenezcan a un mismo linaje clonal determinado por diferentes marcadores (25,28).

De acuerdo al índice de diferenciación genética (Gst) y el análisis de varianza molecular (AMOVA), se sugiere que existen diferencias entre las poblaciones de *P. infestans* según su hospedero, principalmente entre papa - tomate, seguido de pepino - tomate y finalmente entre papa - pepino, lo que indica que la migración y

el flujo de genes entre hospederos es restringido. Estos resultados coinciden con la distribución de los hospederos muestreados, donde los cultivos y huertas de tomate se encontraron en regiones entre 1500 y 2090 m.s.n.m y los de papa, por su parte entre 2600 y 3000 m.s.n.m y no se observó presencia de los dos hospederos en la misma región, lo cual, contribuye a la diferenciación genética observada entre las poblaciones obtenidas de papa y tomate. De esta manera, se observa que el DAPC (Figura 2) clasifica a las poblaciones de *P. infestans* y *P. betacei* de acuerdo al hospedero donde se han obtenido, al igual que se observa en poblaciones clonales de tomate y papa en Bangladesh (17) y de papa y tomate de árbol en Colombia (3,8), apoyando la diferenciación de especies.

El planteamiento anterior es consistente con la preferencia de hospedero reportada en los patógenos, en donde a pesar de realizar la infección en otras solanáceas, la virulencia, tasa de esporulación y agresividad es mayor en el hospedero de donde se aisló el patógeno, presentando mayor aptitud patogénica (23, 29, 30), lo que respalda los resultados obtenidos con el paquete Poppr (Figura 3A) y el software STRUCTURE (Figura 3B), el cual sugiere que cuatro es el número óptimo de poblaciones (Figura 3C) donde la mayoría de aislamientos se asigna correctamente a su hospedero. Estas características de adaptación de la patogenicidad condicionadas principalmente por la aptitud de los patógenos antes que, por la capacidad de causar la enfermedad, son importantes debido a que les permiten usar otros hospederos como alternativos donde pueden permanecer cuando su hospedero principal no se encuentra disponible o las condiciones en él no son adecuadas para su supervivencia (2, 31), lo que podría explicar que uno de los aislamientos obtenidos de tomate presentó un porcentaje de pertenencia cercano al 50% a tomate de árbol (Figura 3A-B). El pepino dulce (*S. muricatum*) se encuentra sembrado en huertas caseras cercanas a cultivos de papa y tomate, por lo que los estudios de la genética de *P. infestans* en este hospedero han sido escasos, en los que se lo ha reportado principalmente como un hospedero alternativo en América Latina (2). Forbes *et al.* (4) aislaron tanto a *P. infestans* como a *P. andina* en pepino, indicando que funciona como reservorio donde el inóculo sobrevive y se propaga a otros hospederos, además Adler *et al.* (32) reportaron cepas con presencia de dos linajes clonales diferentes y tipo de apareamiento A1 y A2 en un campo de *S. muricatum* gravemente afectado por la enfermedad en Ecuador, cuando se creía que la especificidad de hospedero funcionaba como barrera sexual.

Esta dinámica puede verse reflejada en el aumento de la diversidad genética con un impacto importante sobre la estructura poblacional del patógeno, generando nuevas variantes y desplazando a las antiguas (2,5), explicando la cercanía de algunas muestras de *P. infestans* procedentes de pepino y *P. betacei* en el DAPC (Figura 2), así como la clara agrupación de las muestras de acuerdo a su hospedero con un porcentaje de pertenencia al grupo mayor al 60% (Figura 3).

El DAPC de acuerdo al hospedero y región geográfica (Figura 4) y la diferenciación genética indican la agrupación de los aislamientos de *P. betacei* en una sola población de acuerdo al alto flujo genético representado, mientras que los aislamientos de *P. infestans* indican 55% de diferenciación genética entre regiones. Cabe destacar que las plantas de tomate, pepino y tomate de árbol de donde se aisló los patógenos se ubicaron principalmente en huertas caseras que muchas veces albergaban más de una especie de hospedero, por lo cual se podría observar cercanía entre poblaciones con algunos aislamientos, como en cepas obtenidas de *S. lycopersicum* y *S. muricatum* de la misma región del alto Putumayo (Figura 4). El mayor porcentaje de variación genética encontrado dentro de los hospederos o regiones geográficas se explica por la alta diversidad genética que presentaron los patógenos y este resultado es consistente con lo reportado por Chaves *et al.* (26) en Colombia.

A pesar de la elevada diversidad obtenida, similar a la observada en poblaciones con presencia de reproducción sexual como en algunas zonas de Europa (33, 34, 35), donde el porcentaje de GML únicos es alto, en este estudio, no se observó evidencia de recombinación sexual en *P. infestans* obtenido de tomate y pepino de acuerdo al análisis de desequilibrio de ligamiento (Figura 5A-B), lo cual indica que su reproducción es principalmente asexual. Sin embargo, en *P. infestans* proveniente de papa y *P. betacei* el análisis sugiere reproducción sexual (Figura 5C-D). Para respaldar estos resultados es conveniente aumentar el número de loci, Li *et al.* (2013) recomiendan 12 loci polimórficos como lo más apropiado para estudiar la estructura genética de poblaciones sexuales y asexuales (17,36,37).

Cabe destacar que el 90% de los aislamientos obtenidos de *S. tuberosum* fueron triploides, Li *et al.* (21) y Knäus *et al.* (20) reportaron que las cepas de *P. infestans* son principalmente diploides en poblaciones sexuales,

mientras que las poblaciones clonales presentaban triploidia, lo cual reduce su capacidad para la reproducción sexual debido al número desigual de cromosomas. Además, el tipo de apareamiento de *P. betacei* y *P. infestans* se ha determinado hasta la actualidad como A1 sin presencia de aislamientos autofértiles en Colombia (3,8,23), por lo que las posibilidades de reproducción sexual son bajas. Sin embargo, el tipo de apareamiento A2 ha sido reportado en Ecuador (9), haciendo necesario realizar análisis adicionales tanto fenotípicos como genotípicos para complementar la información acerca de la reproducción de las poblaciones de las regiones de Nariño y Putumayo.

Conclusiones

Los cinco marcadores microsatélites evaluados permitieron la caracterización genética de las poblaciones de *P. infestans* y *P. betacei* y fueron polimórficos e infor-

mativos. Las poblaciones de estas especies se estructuraron de acuerdo a su hospedero, evidenciando alto grado de diversidad genética con la presencia de un genotipo multilocus por cada aislamiento. Adicionalmente, el análisis realizado sugiere la presencia de reproducción sexual en *P. infestans* aislados de papa y *P. betacei*.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación e Interacción Social, Universidad de Nariño y a todos los integrantes del Grupo de Investigación Genética y Evolución de Organismos Tropicales por proporcionar las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo.

Conflicto de intereses y financiación

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses. Esta investigación fue financiada por la Vicerrectoría de Investigación e Interacción Social, Universidad de Nariño.

Referencias

1. Fry, W. E., Birch, P. R. J., Judelson, H. S., Grünwald, N. J., Danies, G., Everts, K. L., Gevens, A. J., Gugino, B. K., Johnson, D. A., Johnson, S. B., McGrath, M. T., Myers, K. L., Ristaino, J. B., Roberts, P. D., Secor, G., & Smart, C. D. (2015). Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. *Phytopathology*, 105(7), 966–981. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-15-0005-FI>
2. Lindqvist-Kreuzer, H., Gamboa, S., Izarra, M., Pérez, W., Correa, M. Y., Astete, A., Särkinen, T., Cueva, M., & Gonzáles, P. (2020). Population structure and host range of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in Peru spanning two decades. *Plant Pathol*, 69(2): 334–346. <https://doi.org/10.1111/ppa.13125>
3. Mideros, M. F., Turissini, D. A., Guayazán, N., Ibarra-Avila, H., Danies, G., Cárdenas, M., Myers, K., Tabima, J., Goss, E. M., Bernal, A., Lagos, L. E., Grajales, A., Gonzalez, L. N., Cooke, D. E. L., Fry, W. E., Grünwald, N., Matute, D. R., & Restrepo, S. (2018). *Phytophthora betacei*, a new species within *Phytophthora* clade 1c causing late blight on *Solanum betaceum* in Colombia. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41: 39–55. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.03>
4. Forbes, G. A., Morales, J. G., Restrepo, S., Pérez, W., Gamboa, S., Ruiz, R., ... & Oliva, R. (2013). *Phytophthora infestans* and *Phytophthora andina* on Solanaceous hosts in South America. *Phytophthora: a global perspective*, 48–58.
5. Fry, W. E. (2020). *Phytophthora infestans*: the itinerant invader; “late blight”: the persistent disease. *Phytoparasitica*. 48(1): 87–94. Springer. <https://doi.org/10.1007/s12600-019-00778-3>
6. Tian, Y. E., Yin, J. L., Sun, J. P., Ma, Y. F., Wang, Q. H., Quan, J. L., & Shan, W. X. (2016). Population genetic analysis of *Phytophthora infestans* in northwestern China. *Plant Pathology*, 65(1), 17–25. <https://doi.org/10.1111/ppa.12392>
7. Mathew, D., Anju, P. S., Tom, A., Johnson, N., Lidia George, M., Davis, S. P., Ravisankar, V., & Asha, K. N. (2020). Genome-wide microsatellites and species specific markers in genus *Phytophthora* revealed through whole genome analysis. *Biotech*, 10(10). <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02430-y>
8. Chaves, S. C., Guayazán, N., Mideros, M. F., Parra, M., Lucca, F., & Restrepo, S. (2020). Two clonal species of *Phytophthora* associated to solanaceous crops coexist in central and Southern Colombia. *Phytopathology*, 110(7), 1342–1351. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-19-0175-R>
9. 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 Pathology*, 51(6), 710–719.
10. Berdúo-Sandoval, J. E., Ruiz-Chután, J. A., & Sánchez-Pérez, A. (2019). Evaluación de la resistencia de genotipos de tomate frente a aislados de *Phytophthora infestans* provenientes de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 6, 22–33.
 11. Shimelash, D., & Dessie, B. (2020). Novel characteristics of *Phytophthora infestans* causing late blight on potato in Ethiopia. *Current Plant Biology*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100172>
 12. Griffith, G., & Shaw, D. (1998). Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Appl Environ Microbiol*, 64(10), 4007–4014.
 13. Li, Y., Cooke, D. E. L., Jacobsen, E., & van der Lee, T. (2013). Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J Microbiol Methods*, 92(3), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.021>
 14. Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2014(1), 1–14. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
 15. Hedrick, P. W. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59(8): 1633-1638.
 16. Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.
 17. Wharton, P., Dangi, S., Begum, M. M., Douches, D., & Hokanson, K. E. (2023). Genotypic characterization of *Phytophthora infestans* populations in Bangladesh. *Plant Pathology*, 72(6), 1136–1148. <https://doi.org/10.1111/ppa.13725>
 18. Martin, F., Zhang, Y., Cooke, D., Coffey, M., Grünwald, N., & Fry, W. (2019). Insights into evolving global populations of *Phytophthora infestans* via new complementary mtDNA haplotype markers and nuclear SSRs. *PLoS ONE*, 14(1).
 19. De Miccolis Angelini, R. M., Pollastro, S., & Faretra, F. (2015). Genetics of Fungicide Resistance. En *Fungicide Resistance in Plant Pathogens* (pp. 13–34). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55642-8_2
 20. Knaus, B. J., Tabima, J. F., Shakya, S. K., Judelson, H. S., & Grünwald, N. J. (2020). Genome-wide increased copy number is associated with emergence of dominant clones of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *mBio*, 11(3), 1–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00326-20>
 21. Li, Y., Shen, H., Zhou, Q., Qian, K., Van Der Lee, T., & Huang, S. (2017). Changing ploidy as a strategy: The Irish potato famine pathogen shifts ploidy in relation to its sexuality. *MPMI*, 30(1), 45–52. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-16-0156-R>
 22. Dangi, S., Wharton, P., Ambarwati, A. D., Santoso, T. J., Kusmana, Sulastri, I., Medendorp, J., Hokanson, K., & Douches, D. (2021). Genotypic and phenotypic characterization of *Phytophthora infestans* populations on Java, Indonesia. *Plant Pathology*, 70(1), 61–73. <https://doi.org/10.1111/ppa.13269>
 23. Olave-Achury, A., Cardenas, D., Restrepo, S., Lucca, F., Fry, W. E., Myers, K. L., Danies, G., & Soto-Suarez, M. (2022). Phenotypic and genotypic characterization of *Phytophthora infestans* isolates associated with tomato and potato crops in Colombia. *Phytopathology*, 112(8), 1783–1794. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-21-0158-R>
 24. Hassan, S., Xie, B., Li, Y., Hao Li, H., Ling, J., Yaseen, M., Shahid Iqbal, M., Kun, Q., & Ibrahim Tahir, M. (2020). Population Genetic Analysis of *Phytophthora infestans* in Sichuan, Southwestern China. PREPRINT available at Research Square <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-52556/v1>
 25. Kanetis, L. I., Pittas, L., Nikoloudakis, N., Cooke, D. E. L., & Ioannou, N. (2021). Characterization of *Phytophthora infestans* Populations in Cyprus, the Southernmost Potato-Producing European Country. *Plant Dis*, 105(11), 3407–3417. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2694-RE>
 26. Chaves, S. C., Rodríguez, M. C., Mideros, M. F., Lucca, F., Núñez, C. E., & Restrepo, S. (2019). Determining whether geographic origin and potato genotypes shape the population structure of *Phytophthora infestans* in the central region of Colombia. *Phytopathology*, 109(1), 145–154. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-18-0157-R>
 27. Vargas, A. M., Quesada Ocampo, L. M., Céspedes, M. C., Carreño, N., González, A., Rojas, A., Zuluaiga, 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(1), 82–88. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-1-0082>

28. Kosman, E., & Jokela, J. (2019). Dissimilarity of individual microsatellite profiles under different mutation models: Empirical approach. *Ecol Evol*, 9(7), 4038–4054. <https://doi.org/10.1002/ece3.5032>
29. Kröner, A., Mabon, R., Corbière, R., Montarry, J., & Andrivon, D. (2017). The coexistence of generalist and specialist clonal lineages in natural populations of the Irish Famine pathogen *Phytophthora infestans* explains local adaptation to potato and tomato. *Molecular Ecology*, 26(7), 1891–1901. <https://doi.org/10.1111/mec.14004>
30. Michalska, A. M., Sobkowiak, S., Flis, B., & Zimnoch-Guzowska, E. (2016). Virulence and aggressiveness of *Phytophthora infestans* isolates collected in Poland from potato and tomato plants identified no strong specificity. *Eur J Plant Pathol*, 144(2), 325–336. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0769-6>
31. Leesutthiphonchai, W., Vu, A. L., Ah-Fong, A. M. V., & Judelson, H. S. (2018). How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. *Phytopathology*, 108(8), 916–924. <https://doi.org/10.1094/PHTO-04-18-0130-IA>
32. Adler, N. E., Chacón, G., Flier, W. G., & Forbes, G. A. (2002). The Andean fruit crop, pear melon (*Solanum muricatum*) is a common host for A1 and A2 strains of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Plant Pathology*, 51(6).
33. Kiiker, R., Skrabule, I., Ronis, A., Cooke, D. E. L., Hansen, J. G., Williams, I. H., Mänd, M., & Runno-Paurson, E. (2019). Diversity of populations of *Phytophthora infestans* in relation to patterns of potato crop management in Latvia and Lithuania. *Plant Pathology*, 68(6), 1207–1214. <https://doi.org/10.1111/ppa.13030>
34. Runno-Paurson, E., Agho, C. A., Zoteyeva, N., Koppel, M., Hansen, M., Hallikma, T., Cooke, D. E. L., Nassar, H., & Niinemets, Ü. (2022). Highly diverse *Phytophthora infestans* populations infecting potato crops in Pskov region, North-West Russia. *J Fungi*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/jof8050472>
35. Runno-Paurson, E., Kiiker, R., Joutsjoki, T., & Hannukkala, A. (2016). High genotypic diversity found among population of *Phytophthora infestans* collected in Estonia. *Fungal Biol*, 120(3), 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.11.008>
36. Alor, N., Tierno, R., Cooke, D. E. L., & de Galarreta, J. I. R. (2019). Characterisation of *Phytophthora infestans* Isolates of Potato Crops from Spain. *Potato Res*, 62(4), 453–463. <https://doi.org/10.1007/s11540-019-9422-7>
37. Maurice, S., Montes, M. S., Nielsen, B. J., Bødker, L., Martin, M. D., Jønck, C. G., Kjøller, R., & Rosendahl, S. (2019). Population genomics of an outbreak of the potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, reveals both clonality and high genotypic diversity. *Mol Plant Pathol*, 20(8), 1134–1146. <https://doi.org/10.1111/mpp.12819>