

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

FACULTAD DE CIENCIAS APLICADAS
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PROGENIE
DE *Phytophthora infestans*”**

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Elaborado por:

Verónica Alexandra Hidalgo Mata

Director: M.Sc. Claudia Segovia

Codirector: Dra. Karina Proaño

Sangolquí, 2006-07

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Ricardo Oliva por su incondicional apoyo como tutor en la realización de mi tesis de graduación.

A Francisco Jarrín y Marcelo Vinueza por su ayuda constante en todo lo referente a las técnicas del laboratorio.

A las Dras. Claudia Segovia y Karina Proaño por su ayuda y apoyo como Director y Codirector respectivamente en la realización de mi tesis.

Al Centro Internacional de la Papa especialmente al Dr. Gram. Thiele por abrirme sus puertas para poder realizar mis tan anhelados sueños, conjuntamente con FORTIPAPA por haber colaborado en la elaboración del proyecto

A mis amigas y amigos, Sofi, Arturo, Jorge, José, Paola, Birgit, Johanna, Petter, Fadia, Cecilia, Soledad, Rosa, Margot, Susana, por brindarme su ayuda, comprensión y tiempo.

A mis padres Milton y Mercedes por el cariño, amor, comprensión, ánimos, alegría y apoyo que me supieron dar durante mi vida y especialmente durante la realización de mi proyecto de grado.

A mis hermanos David, Evelyn y Wendy por su inigualable cariño, por los momentos alegres que he pasado y pasare junto a ellos.

A mis abuelitos, tíos, primos, futuros cuñados/as por su amor brindado.

A Dios por todo el amor inimaginable que recibí de su parte, por estar conmigo en las buenas y malas, por nunca haberme dejado , por haberme dado la familia que tengo y especialmente por haber bendecido mis sueños.

Y a todos aquellos que por falta de espacio no han sido nombrados como son mis compañeros de la primera promoción de egresados de la Facultad de Ingeniería en Biotecnología

Verónica Hidalgo Mata

DEDICATORIA

Dedicado a mi Padre Celestial por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis en el Centro Internacional de la Papa

Verónica Hidalgo Mata

INDICE GENERAL

Títulos

Pg.

CERTIFICACIÓN DE LA ELABORACIÓN DEL PROYECTO

.....II

LEGALIZACIÓN DEL

PROYECTO.....III

DEDICATORIA.....

IV

AGRADECIMIENTO.....

V

ÍNDICE GENERAL

.....VII

ÍNDICE DE FIGURAS

.....X

ÍNDICE DE TABLAS

.....XII

ÍNDICE DE

ANEXOS.....XIV

RESUMEN

.....XV

ABSTRACT.....XV

II

Capítulo 1:

GENERALIDADES

1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes.....	2
1.3 Justificación e Importancia	6
1.4 Objetivos	9
1.4.1 Objetivo General	9
1.4.2 Objetivos Específicos	9

Capítulo 2:

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Taxonomía	10
Ciclo de la Enfermedad	10
2.2 Genética Poblacional	13
2.2.1 Migraciones	13

2.2.2 Linajes clonales y estructura genética de las poblaciones	17
2.2.3 Marcadores usados para la caracterización de poblaciones	21
2.3 Técnica Moleculares	22
2.3.1 Técnicas a nivel enzimático	24
2.3.1.1 Análisis de Pep (peptidasa)	25
2.3.1.2 Análisis de Gpi (glucosa-6-fosfato isomerasa) ..	26
2.3.2 Técnicas a nivel molecular	26
2.3.2.1 Microsatélites.....	26
2.3.2.2 DNA Mitocondrial	28
2.3.2.3 RFLP.....	29

Capítulo 3:

METODOS

3.1 Extracción y conservación de ADN	31
--	----

3.2 Marcadores Moleculares	
32	
3.2.1 Antecedentes	
32	
3.3 Técnicas a nivel enzimático.....	
33	
3.3.1 Análisis de Pep (peptidasa)	
33	
3.3.2 Análisis de Gpi (glucosa-6-fosfato isomerasa)	
...35	
3.3.3 Técnicas a nivel molecular.....	
36	
3.3.3.1 Microsatélites	
36	
3.3.3.2 DNA Mitocondrial	
37	
3.3.3.3 RFLP	
40	
Análisis Estadístico	43
Capítulo 4:	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Resultados.....	45
4.2 Discusión	54
Capítulo 5:	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	

5.1	Conclusiones.....	61
5.2	Recomendaciones.....	63
	Referencias Bibliográficas	64

LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1	Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i>	11
Figura 2.2	Oosporas producidas por recombinación sexual	12
Figura 4.1. 1	Dendograma Familia 18, 27, 34, 35, 38, 44 y 45	48
Figura 4.1. 2	Dendograma Familia 29 y 39	49
Figura 4.1. 3	Dendograma Familia 37	51

Figura 4.1. 4	
Dendograma Familia 42	53
Figura 4.2. 5	
Dendograma RFLP	57
Figura 4.2. 6	
Análisis de componentes principales	59
Figura 4.1	
Patrón de bandas Análisis de Pep.....	90
Figura 4.2	
Patrón de bandas Análisis de Gpi.....	91
Figura 4.3. 1	
Haplotipo mitocondrial región P2	92
Figura 4.3. 2	
Haplotipo mitocondrial región P4	93
Figura 4.4. 1	
Microsatélites locus Pi 4B	94
Figura 4.4. 2	
Microsatélites locus Pi 1F	95
Figura 4.4. 3	
Microsatélites locus Pi 2D	96
Figura 4.5	
RFLP.....	97

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.2.2.1	
Linajes Clonales de <i>Phytophthora infestans</i> detectados en Estados Unidos y Canadá	
...18	
Tabla 2.2.2.2	
Genotipos de Pep, Gpi y RFLP en Ecuador	
...20	
Tabla 2.2.2.3	
Linajes Clonales reportados en Ecuador	
21	

Tabla 4.1.1. 1 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 18 y 27 para análisis de Pep	77
Tabla 4.1.1. 2 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 29 y 34 para análisis de Pep	78
Tabla 4.1.1. 3 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 35 y 37 para análisis de Pep	79
Tabla 4.1.1. 4 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 38 y 39 para análisis de Pep	80
Tabla 4.1.1. 5 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 42 y 44 para análisis de Pep	81
Tabla 4.1.1. 6 Segregación de genotipos en la progenie de la Familia 45 para análisis de Pep	82
Tabla 4.1.2. 1 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 18 y 27 para análisis de Gpi	83
Tabla 4.1.2. 2 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 29 y 34 para análisis de Gpi	84
Tabla 4.1.2. 3 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 35 y 37 para análisis de Gpi	85
Tabla 4.1.2. 4 Segregación de genotipos en la progenie de las Familias 38 y 39 para análisis de Gpi	86

Tabla 4.1.2. 5	
Segregación de genotipos en la progenie de las	
Familias 42 y 44 para análisis de Gpi	
87	

Tabla 4.1.2. 6	
Segregación de genotipos en la progenie de la	
Familia 45 para análisis de Gpi	
88	

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1	
Manual de Usuario para Microsatélites	
99	

Anexo 2	Resumen	de	los	Resultados
Cuadro				
.....				108
Anexo 3	Global	de	Distancias	Genéticas
Dendograma				
.....				112
Anexo 4	de	las	familias	analizadas
Listado				
.....				113
Anexo 5				
Matriz de presencia y ausencia de bandas				
para análisis con NTSYS.....				114

Capítulo 1:

GENERALIDADES

1.1 Introducción

A partir del siglo XIX el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) se convirtió en uno de los más importantes a nivel mundial, previa la introducción en Europa y Asia a finales de siglo XVI. Este era considerado uno de los alimentos fundamentales en familias de clase media y baja, sin embargo la aparición de un patógeno (*Phytophthora infestans*) desconocido para los agricultores causó grandes destrozos a nivel mundial y en el año de 1845 devastó los cultivos de papa dando origen a la gran hambruna de 1846 en Irlanda (Robertson, 1991; y Ribero, 1996a), como resultado de la enfermedad muchas personas murieron y otra gran parte emigró a países de América.

Por muchos años *Phytophthora infestans* fue la causa principal de grandes pérdidas económicas especialmente en Europa, y una de las enfermedades más importantes en el mundo (Zentmyer, 1985).

Phytophthora infestans, apareció repentina y dramáticamente, ocasionando gran devastación en los cultivos de papa y tomate, lo que causó la hambruna en la población consumidora. Al principio la enfermedad fue sumamente destructiva. Tanto las condiciones climáticas como el ciclo reproductivo eran completamente desconocidos para los agricultores, lo que acrecentó el impacto

de la enfermedad en esa época. Esto es común en las enfermedades de las plantas, cuando aparecen por primera vez son altamente peligrosas, después de estudiarlas, con un control adecuado se pueden controlar, y en algunos casos erradicarlas (Robertson, 1991).

En la actualidad *Phytophthora infestans* está siendo estudiado por algunos países que han sido afectados por la enfermedad, tal es el caso del Ecuador, sin embargo se ha descubierto que el patógeno se adapta no solo a su hospedero inicial que fue la papa, sino que también al tomate, y a otras plantas del género *Solanum*. Mediante el uso de marcadores moleculares específicos para este patógeno se han descrito varios linajes clonales que ayudan a la caracterización del mismo, los mismos que son importantes para la determinación de diferentes genotipos que pueden llegar a ser mas agresivos que los progenitores, especialmente si se analiza una progenie sexual, junto con el porcentaje de variación genético.

1.2 Antecedentes

Phytophthora infestans es uno de los principales patógenos que afectan al género *Solanum* causando la enfermedad conocida con el nombre de tizón tardío o lancha en algunas regiones del mundo.

El centro de origen de *Phytophthora infestans* es México, desde donde se han reportado varias migraciones en los últimos treinta años. La primera migración se llevó a cabo durante la primera mitad del siglo XIX y fue la que devastó los

cultivos de papa en toda Europa entre 1845 y 1846. Migraciones más recientes han distribuido el patógeno a todos los continentes.

En Asia la prioridad en la generación de la enfermedad se ha dado sobre todo a la selección y al uso de variedades resistentes, así como el uso de fungicidas (Ridomil systemic incluyendo -- metalaxyl dithane M-45 -- o del contacto). Sin embargo, debido a la interrupción rápida de la resistencia al patógeno (producida por genes importantes en la resistencia del anfitrión o el patógeno a los fungicidas), del anfitrión es más difícil manejar la enfermedad, incluyendo a su vez factores sociales y ambientales. En China, la epidemia ha sido desde los años noventa más inesperada y continuamente severa (Wei *et al*, 1998).

En Costa Rica, el Valle Central es la principal área de producción de cultivos de papa el mismo que se ubica en las laderas del Volcán Irazú, provincia de Cartago a 1200 — 3000 msnm. Mientras que el tomate se cultiva en un número mayor de localidades, entre 1200 y 1500 msnm. *Phytophthora infestans* es difícil de manejar, principalmente porque estos cultivos se siembran durante todo el año, lo cual permite al hongo mantener una alta cantidad de inóculo, además las condiciones de clima en el Valle Central son favorables al patógeno. En los últimos años, el manejo de esta enfermedad se ha complicado por el desarrollo de resistencia de *Phytophthora infestans* a fungicidas como el metalaxil (Vera *et al*, 2000).

En Colombia se han visto cambios que han agravado o complicado el manejo de la gota, generalmente por reducciones en el nivel de sensibilidad a los

fungicidas de alta especificidad. Las variedades de papa sembradas en Colombia son altamente susceptibles a este patógeno, y la protección de las cosechas está basada en el uso de fungicidas. Si la enfermedad no es controlada a tiempo puede ocasionar pérdidas hasta del 100% (Maldonado *et al*, 1999).

En Ecuador durante los últimos diez años se ha visto la presencia de cambios en las poblaciones de *Phytophthora infestans*, cambios que se relacionan con la aparición de nuevos genotipos acompañada de un aumento drástico en los factores de virulencia, aparición de una importante fracción de la población del patógeno con resistencia al metalaxil y severas epidemias observadas en los últimos años en cultivares de papa relativamente resistentes al patógeno (Andrade, 1998).

La mayoría de las especies de *Phytophthora* son consideradas saprófitos poco eficientes pero patógenos muy agresivos (Brasier *et al*, 1992). Particularmente, la especie *Phytophthora infestans* presenta más características de parásito obligado que saprófito facultativo. El género *Phytophthora* presenta dos tipos de reproducción, asexual (con la formación de esporangios que contienen las zoosporas) y sexual (con la formación de oosporas). Las zoosporas son las estructuras primarias que se forman en los esporangios las cuales sirven para causar nuevas infecciones, estas pueden nadar cortas distancias en un suelo con humedad elevada y grandes distancias mediante irrigación. Las oosporas por lo general se presentan de manera individual, ocupando de forma relativa

toda la cavidad del oogonio, es de forma esférica, lisa y moderadamente verrugosa, es por lo general incolora (Echemendia, 2002).

En *Phytophthora infestans* se han determinado dos tipos de apareamiento conocidos como A1 y A2, la presencia del tipo A1 no es muy preocupante para los investigadores de este patógeno debido a que se reproduce de forma asexual, con el apareamiento del tipo A2 existe preocupación porque con la estimulación del tipo A1 existe la recombinación y la formación de especies más agresivas (William *et al*, 1997).

Phytophthora infestans es un organismo heterotálico, bisexual y auto-incompatible, es decir que necesita dos tipos de apareamiento (A1 y A2) para completar su ciclo sexual. Cuando ambos tipos de apareamiento interactúan producen estructuras sexuales llamadas oosporas (espora de pared gruesa desarrollada a partir de una oosfera). La importancia de las oosporas dentro del ciclo vital del patógeno es que incrementan la variabilidad genética dentro de la especie, con la posibilidad de generar genotipos más agresivos.

1.3 Justificación e Importancia

Ecuador es uno de los países que cultiva unas 55000 ha anuales de papa debido al clima que le permite realizarlo en la sierra durante todo el año (Oyarzun, 2001).

Como ya se dijo anteriormente una de las enfermedades más conocidas por el género *Solanum* es el **tizón tardío**, esta se debe a la presencia de un oomiceto llamado *Phytophthora infestans*, el cual causa necrosis y muerte de los tejidos de las hojas, atacando a los cultivos desde la emergencia del mismo.

Los costos de protección contra *Phytophthora infestans* se estiman entre US\$ 5 y 25 millones. A menudo los pequeños productores no están en condiciones económicas de proteger al cultivo con fungicidas. El 30% de las parcelas prospectadas en el 2000 en la zona central del Ecuador fueron abandonadas debido al tizón. El manejo del tizón es complejo y se considera que debe estar basado primariamente en la reducción de la tasa de infección (Oyarzun, 2001).

Phytophthora es uno de los géneros más estudiados alrededor del mundo, debido a su complejo ciclo reproductivo, y a sus características que lo confunden muchas veces como hongo, sin embargo no lo es. Uno de los temas más importantes para la investigación es el tipo de reproducción que posee, al ser *Phytophthora* un organismo bisexual y autoincompatible que necesita de los dos tipos de apareamiento tanto el A1 como el A2 para poder completar un ciclo sexual. Las esporas se forman sólo si dos cepas compatibles se encuentran en el mismo ambiente. Al encontrarse, una de las cepas da origen a uno de los gametos, y la otra al gameto opuesto. Estas cepas han sido convenientemente denominadas tipo de apareamiento A1 y tipo de apareamiento A2. Si dos cepas con el mismo tipo de apareamiento (sea A1 o A2) se encuentran, no se producen las oosporas.

Debido a que en el Ecuador se ha descubierto el tipo de apareamiento A2 en especies silvestres, es de suma importancia el estudio de la reproducción sexual del patógeno. Pruebas *in vitro* preliminares han demostrado que no existen barreras sexuales entre poblaciones de *Phytophthora* por esta razón existen dos motivos para su estudio, uno es el incremento del intercambio de material genético que producirá mayor variabilidad en la progenie dándole al patógeno una ventaja evolutiva, es decir la habilidad de colonizar nuevos hospederos y el otro es el intercambio de componentes de virulencia entre distintas poblaciones que pueden o no generar genotipos más agresivos a los ya existentes en el país.

Mediante el uso de marcadores moleculares se puede determinar la variabilidad genética de la progenie en comparación con los padres. Es importante determinar el grado de variabilidad genética existente en la progenie, debido a que pueden desarrollarse genotipos más agresivos por el intercambio y mezcla de los factores de virulencia.

Los marcadores moleculares ofrecen varias ventajas sobre aquellos de tipo isoenzimático debido a su capacidad de detectar polimorfismo, por lo que las estimaciones de variabilidad genética tienden a ser más robustas (Hartl *et al*, 1994), la mayoría de los marcadores representan variabilidad en regiones no-codificantes del DNA, su variación es neutral desde el punto de vista de selección natural y difieren en la cantidad de variabilidad que ilustran. Es necesario ajustar el tipo de marcador a cada problema y su escala espacial. Los tipos de marcadores son por lo general *codominantes* (patrones de bandas

distinguibles en homocigotos y en heterocigotos), *dominantes* (Griffiths, 2000; Pérez, 1998).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Caracterizar molecularmente a la progenie de *Phytophthora infestans* obtenida en el CIP y compararla con los progenitores.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar la técnica de microsatélites para el análisis de DNA
- Determinar la existencia de híbridos en la progenie
- Determinar si la progenie se rige a un cruzamiento de tipo mendeliano
- Determinar haplotipos mediante el análisis del mt DNA
- Determinar la transferencia de alelos

Capítulo 2:

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

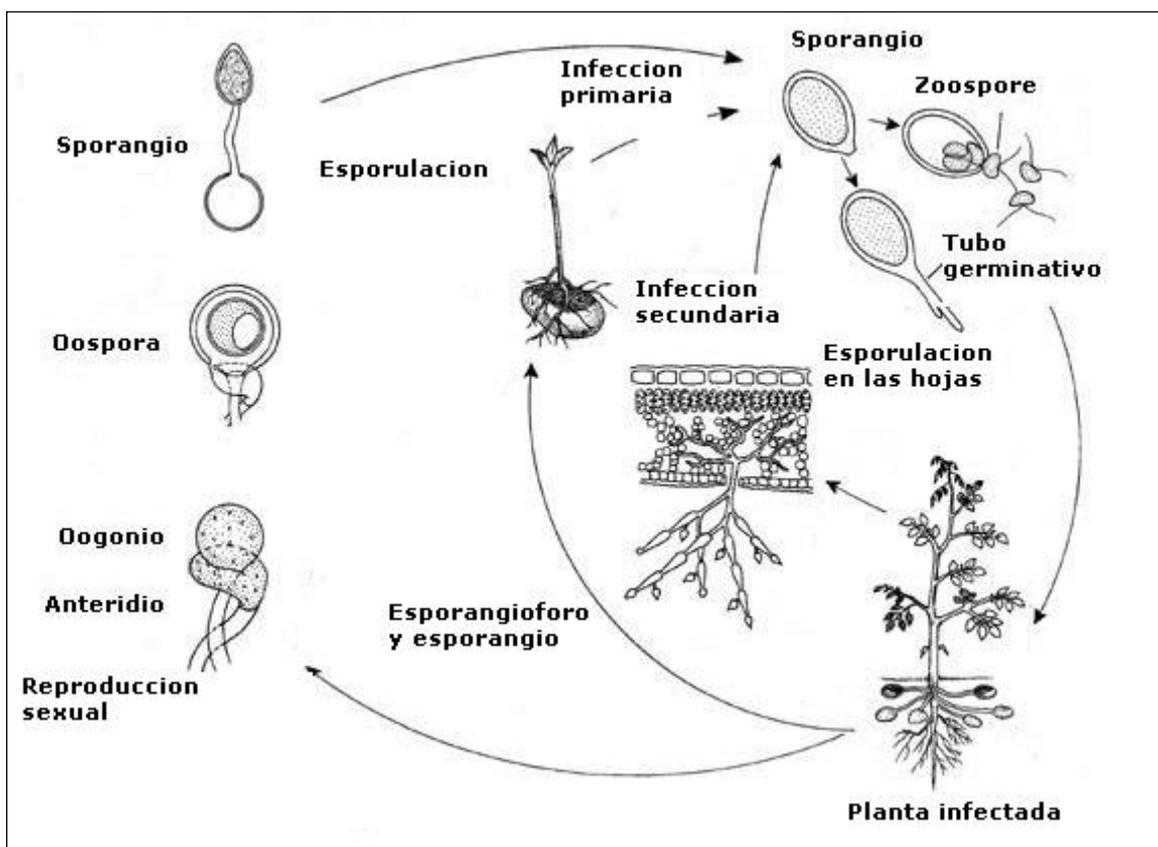
2.1 Taxonomía

Phytophthora infestans es un oomiceto que pertenece a la subclase *Peronosporomycetidae*, orden *Pythiales*, familia *Phythiacea*, del Phylum *Oomycota*. (Erwin y Ribeiro, 1996a).

Por sus características diferentes a los demás grupos de hongos inferiores como son su tipo de reproducción sexual a través de gametangios, formación de oosporas, formación de zoosporas asexuales dentro de los esporangios y pared celular compuestas con B-glucanos en vez de quitina (Erwin y Ribero, 1996a), se relacionan mas con los oomycetos con las algas pardas y diatomeas, considerándolos como protistas dentro del Reino *Chromista*

Ciclo de la enfermedad

Al sembrar tubérculos infectados, éstos dan origen a plantas enfermas como se puede observar en el esquema 2.1 El oomiceto esporula (producción de esporangios) sobre la superficie de los tallos y las hojas. Las esporas son dispersas a otras plantas, por el viento o por el salpique del agua de lluvia o riego por aspersión. Bajo condiciones de temperatura y humedad adecuadas, las esporas germinan inmediatamente e invaden el nuevo tejido. Si las condiciones persisten, la enfermedad continúa su desarrollo y en pocas horas



el hongo esporula de nuevo, siendo capaz de infectar otras plantas. Las esporas también pueden ser lavadas de las hojas y caer al suelo, penetrar en el mismo e infectar los tubérculos nuevos producidos por la planta. De esta manera la enfermedad asegura su pase al siguiente cultivo (Rodríguez, 1996).

Figura 2.1 Esquema del ciclo de vida de *Phytophthora infestans*. Se muestran los mecanismos de reproducción tanto el sexual como el asexual (Romagna, 2006)

Las oosporas o esporas sexuales (Figura 2.2) se forman cuando los micelios con distinto tipo de apareamiento A1 y A2 crecen juntos, es decir caen sobre la misma planta produciéndose la formación en uno de ellos de células masculinas (anteridio) y en el otro células femeninas. El oogonio del uno crece a través del anteridio del otro permitiendo la fertilización y convirtiéndose en espora de descanso para resistir condiciones desfavorables (este oogonio se encuentra en hojas, tallos y tubérculos). Cuando no existen tipos de apareamiento distinto, las oosporas no se producen, sino que se desarrolla un tubo germinativo sobre el cual se forma un zoosporangio conocido como unidad de reproducción asexual, que se da por la unión del anteridio con el oogonio del mismo tipo, sobreviviendo a través del micelio en los tejidos de la planta, este germina y las zoosporas inician un nuevo ciclo de vida (Rodríguez, 1996; Jaramillo, 2003).

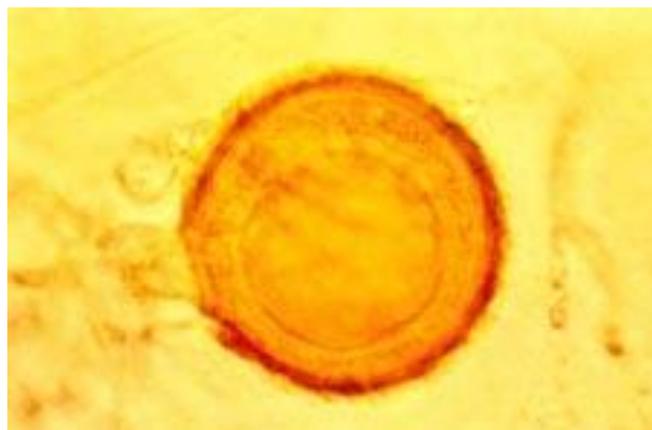


Figura 2.2 Fotografía de oosporas producidas por recombinación sexual
(informe anual CIP 1998)

El ciclo de la enfermedad puede repetirse varias veces en un período de cultivo, especialmente si las condiciones medioambientales son favorables para su reproducción. Esto sumado a la agresividad de la cepa (o población), y la susceptibilidad del cultivo determinan la capacidad destructiva de la epidemia (Rodríguez, 1996).

2.2 Genética Poblacional

2.2.1 Migraciones

Existen evidencias que el centro de origen de *Phytophthora infestans* fue en el centro de México, debido a la gran diversidad genética del patógeno en esta región en comparación con el resto de América y Europa (Niederhauser, 1961).

Las migraciones de *Phytophthora infestans* se dice que comenzaron desde 1840. En 1843 se reportó una enfermedad de la papa en Estados Unidos en las cercanías a Philadelphia, en 1845 dos años más tarde, se reportó sobre la enfermedad en provincias costeras de Canadá y el noreste hacia el centro de los Estados Unidos, en 1848 se dieron los primeros reportes de la enfermedad en Europa, estos provinieron de Bélgica. Una vez introducida la enfermedad

en Europa, se disipó por todo el mundo, debido a la comercialización de la semilla (Fry *et al*, 1991).

La primera migración global ocurrió en tres etapas, cada una de las cuales fue un evento fundador, primero en Estados Unidos, después en Europa y finalmente alrededor de todo el mundo (en áreas paperas). Durante el año de 1840 a 1970 la mayoría de infecciones pertenecen a un linaje clonal (genotipo) único conocido como US-1 y la existencia de este único linaje clonal redujo el nivel de variación genética en las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Goodwin, 1997).

La segunda migración data de la década de los setenta, debido a que no existió más flujo genético fuera de México. Las migraciones ocurridas no se establecieron, hasta los años de 1976 y 1977 donde 25.000 toneladas de papa fueron trasladadas hacia Europa, llevando consigo también la enfermedad (Goodwin, 1997). Durante este período de migración se reportó la existencia de un nuevo tipo de apareamiento que generó más variabilidad, como ejemplo está Alemania y Países Bajos con el tipo A2 (Fry *et al*, 1992). Este tipo de apareamiento fue encontrado en Europa, América, África y Asia, con excepción de la Antártida y Australia en los años 90 (Zhang *et al*, 2001).

El descubrimiento del tipo A2 en Suiza, en 1984, fue el primer reporte de este tipo de apareamiento fuera de México; este hallazgo estimuló la búsqueda del

tipo A2 en otras partes del mundo, habiéndolo encontrado hasta el momento en Europa, Sur América, Estados Unidos y Canadá. Al parecer, el tipo A2 migró de México a Europa en 1976 en un cargamento de 25.000 toneladas de papa. De Europa, el tipo A2 se dispersó a otras partes del mundo (Goodwin *et al*, 1996).

Durante la década de los ochenta, el tipo de apareamiento A2 fue detectado en varios países de Europa. Estos nuevos genotipos A2 poseían nuevos alelos reconocidos por los marcadores moleculares utilizados en esa época. Este hecho posibilitó el incremento en la diversidad genética debido a la reproducción sexual.

La tercera migración es menos certera que las dos anteriores, donde se supone que a finales de los años 70 se produjo desde el noroeste de México hacia los Estados Unidos, en donde se conoció el linaje clonal US- 6 (Goodwin, 1997). La cuarta migración (Canadá, México y Estados Unidos) trajo consigo dos nuevos genotipos que fueron US- 7 y US- 8 (Goodwin, 1997).

Los estudios realizados en América Latina sobre *Phytophthora infestans* reportan que en el Ecuador y Brasil han existido cambios poblacionales, la mayoría de los cuales han agravado el manejo de la enfermedad, reduciendo la sensibilidad a los funguicidas. Estos cambios se los atribuyen a la recombinación genética que generalmente se da por reproducción sexual, y también a las migraciones directas de los nuevos genotipos a diferentes regiones (Maldonado, 2002).

La recombinación implícita en reproducción sexual puede incrementar la variabilidad genética, alterar la estructura de las poblaciones de *Phytophthora infestans* y generar genotipos más agresivos, con mayor éxito reproductivo y con combinaciones agresivas de virulencia (Samaucha y Gisi, 1987).

Actualmente en el Ecuador los ensayos sobre *Phytophthora infestans* indican que la diversidad del patógeno no ha sido descrita en su totalidad, existe un riesgo de recombinación entre genotipos que coexisten, aunque filogenéticamente sean distantes, siendo importante desarrollar estudios más exhaustivos sobre el patógeno y su variabilidad (Adler, 2003; Oliva *et al*, 2002).

Con el pasar de los años, se ha llegado a obtener un mayor conocimiento sobre la enfermedad, en especial sobre la presencia de nuevos genotipos altamente virulentos, los cuales hacen necesaria la caracterización de las poblaciones de *Phytophthora infestans*, tanto a nivel enzimático (Gpi, Pep) como a nivel molecular microsatélites, RFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción), mtDNA (Therrien, 1993).

2.2.2 Linajes clonales y estructura genética de las poblaciones

Según Anderson y Kohn (1995) los linajes clonales son los descendientes asexuales de un genotipo dado que difieren del original solamente por vía de la mutación y recombinación mitótica, es decir que son derivados de un mismo genotipo descendientes de un ancestro clonal.

Los linajes clonales son muy útiles para los organismos con reproducción asexual y con estructuras homogéneas muy simples de una población, de esta forma los linajes individuales pueden ser identificados. Se han definido varios linajes clonales para *Phytophthora infestans* basados en la utilización de diferentes marcadores genéticos como son: el tipo de apareamiento (que puede ser A1 y A2), glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*), peptidasa (*Pep*), Análisis de DNA mitocondrial y la prueba RG57 de RFLP, la mayoría de linajes identificados en los Estados Unidos y Canadá se encuentran en la tabla 2.2.2.1 (Goodwin, *et al*, 1995b).

Tabla 2.2.2.1 Linajes Clonales de *Phytophthora infestans* detectados en Estados Unidos y Canadá, US-1, UDS-6, US-7, y US-8 han sido localmente predominantes, y US-8 ha sido nacionalmente predominante desde 1995.

Lineage	MT ¹	met ²	Spec ³	<i>Gpi</i>	<i>Pep</i>	Dates ⁴
US-1	A1	S	P(t)	86/100	92/100	? - (1993)

US-6	A1	R	P-T	100/100	92/100	1980s -93
US-7	A2	R	P-T	100/111	100/100	1992 - ?
US-8	A2	R	P	100/111/122	100/100	1992 - ?
US-11	A1		(P-T)	100/111	100/100	1994 - ?
US-12	A1			100/111	92/100	1994 - ?
US-13	A2			100/100	100/100	1994 - ?
US-14	A2		(P)	100/122	100/100	1994 - ?

¹ MT es el tipo de apareamiento (A1 y A2).

² met se refiere a la resistencia al matalaxil: S = sensible; R= resistente.

³ Spec se refiere a la especialización del patógeno. Muchos aislados son sobre todo patógenos de la papa (P), y otros son patógenos de ambos papa y tomate (P-T) El linaje clonal US-1 contiene pocos individuos que son para ambos (papa y tomate), pero la mayoría son patógenos para la papa.

⁴ Los años se refieren al tiempo en el cual los linajes fueron comunes durante ese tiempo, el Linaje clonal US- 1 parece raro desde 1993, el linaje clonal ha declinado en su frecuencia desde 1993.

Estos linajes clonales tienen utilidad porque ciertos rasgos epidemiológicos se asocian a linajes específicos. Por ejemplo los aislados del linaje US-1 han sido en gran parte sensibles al metalaxyl, el mismo que conserva su actividad excelente en suprimir las epidemias establecidas causadas por US-1. Sin embargo, los aislados que tienen los linajes US-6, US-7, y US-8 no son afectados en su gran mayoría por este fármaco, y la eficacia del mismo en

suprimir las epidemias causadas por estos linajes se elimina en gran manera. Además, los aislados que tienen los linajes US-6 y US-7 son especialmente agresivos a los tomates y el conocimiento que un aislado de cualquiera de estos linajes está en un área es especialmente importante para los cultivadores del tomate (Goodwin *et al*, 1995a).

Estudios realizados en el Ecuador demuestran la existencia de variantes en las pruebas para la caracterización de los aislados de *Phytophthora infestans*, describiendo un tipo de linaje diferente al cual se lo ha llamado EC- 1, y está definido por los valores en Gpi y Pep de 90/100 y 96/100 respectivamente, RFLP difiere del linaje US- 1 por tres bandas, en donde se asume que este genotipo fue causado por una mutación o recombinación mitótica, como se muestra en la tabla 2.2.2.2 (Forbes *et al*, 1997b).

Tabla 2.2.2.2 Genotipos de las aloenzimas glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*) y peptidasa (*Pep*), y polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) huellas digitales de los aislados de *Phytophthora infestans* colectados en Ecuador.

año	Genotipos de las enzimas			RFLP huella digital		Linaje
	Numero	<i>Gpi</i>	<i>Pep</i>	Numero	Bandas 1 a 25	
1990 a 1992	5	86/100	92/100	3	1 0 1 1 1 0 1 0 1 1 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 1 1 0 0 1 1	US-1
1	95	90/100	96/100	48	1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 1	EC-1
1b	1	90/100	96/100	1	1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 1	EC-1b

1993	1	86/100	92/100	NTc		US-
1						
	109	90/100	96/100	16	1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 0 0 1 1 0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 1	EC-
1						
	1	90/100	96/100	1	1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 1 1 0 1 0 0 0 1 1 1 0 1 1	EC-
1b						

a Linajes clonales fueron determinados por huella digital de DNA y genotipos de las aloenzimas.

b Difiere del genotipo predominante EC-1 por un locus (delineado).

c No testeado.

Continuando con los estudios, se demostró la existencia de ciertos tipos de linajes que se relacionan con algunos hospederos, como por ejemplo los aislados de papa (*S. phureja*, *S. tuquerrense* y *S. colombianum*) pertenecen al linaje EC- 1 descrito en el Ecuador. Sin embargo se descubrió un tipo de linaje diferente a los anteriormente descritos que ataca a *S. brevifolium* y *S. tetrapetalum* a este tipo de linaje se lo denominó EC- 2 y su variante con 3 bandas de diferencia en RFLP EC- 2.1. Además debido a la ausencia de una banda en la prueba de RFLP se reporto como el linaje EC- 3 que se relaciona con *S. betaceum*, como se muestra en la tabla 2.2.2.3 (Erselius *et al.*, 1999).

Tabla 2.2.2.3 Linajes Clonales reportados en Ecuador

Linaje Clonal	Gpi	Pep	MtDNA
US- 1	86/100	92/100	IB
EC- 1	90/100	96/100	IIA
EC- 2	100/100	76/100	nuevo

EC- 3	86/100	76/100	IA
-------	--------	--------	----

El descubrimiento de estos tipos de linajes ha hecho que resurja el interés por el estudio de este patógeno, especialmente en regiones andinas como es el caso del Ecuador.

2.2.3 Marcadores usados para la caracterización de poblaciones

Para la descripción de los linajes clonales se han determinado cierto tipo de marcadores relacionados con *Phytophthora infestans* que se los ha dividido en dos marcadores genotípicos y fenotípicos. Dentro de los marcadores fenotípicos, Fry *et al* (1993) reconoce tres tipos que son resistencia al metalaxil, tipo de apareamiento y virulencia. Dentro de los genotípicos describe, aloenzimas (Pep y Gpi), fingerprinting de DNA (RFLP prueba RG57) y haplotipo mitocondrial. En la actualidad se está utilizando la técnica de microsatélites para la caracterización de las especies (Knapova, *et al.*, 2001).

2.3 Técnica Moleculares

El ser humano, ha sido capaz de seleccionar y mejorar especies vegetales, animales y microbianas, basándose en la parte fenotípica. La mejora genética ha sido posible gracias a la variabilidad genética, a la heredabilidad del carácter a aislar, a la eficacia e intensidad de la selección aplicada, y al tiempo necesario para realizar la selección. Tradicionalmente la taxonomía se dedica al estudio de la parte morfológica, a través de la observación de los organismos en diferentes etapas de desarrollo, (muchas veces estos influenciados por la

parte ambiental). Actualmente la aparición de los marcadores moleculares dio un giro sorprendente en el estudio y análisis de los organismos, dejando a un lado la selección basada exclusivamente en el fenotipo, sino que ahora el genotipo también es esencial para estos fines (Claros, 2002).

Los marcadores moleculares han contribuido a un mayor conocimiento genético de muchas especies vegetales. Además de su importancia para el conocimiento básico de estudios genéticos y evolutivos, incluyendo los análisis de biodiversidad, los marcadores moleculares son de utilidad para construir mapas de ligamiento y para localizar rasgos mono y poligénicos, que permiten introducir y seleccionar de manera eficiente individuos con características específicas. Estos marcadores posibilitan la selección de individuos en fases juveniles en los programas de mejora. Además, los marcadores juegan un papel importante en el aislamiento y clonación de genes mediante el empleo de mapas genéticos (Ritter, *et al.*, 2004).

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Estas biomoléculas pueden ser identificadas a nivel protéico (antígenos e isoenzimas) y de DNA (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables). Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, Por el

contrario, un marcador polimórfico es aquel que presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se lo conoce que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariable (Claros, 2002).

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico. La desventaja de esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del DNA recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el DNA, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades (Claros, 2002).

2.3.1 Técnicas a Nivel enzimático

La presente técnica se basa en el estudio de isoenzimas que son distintas formas moleculares de una misma enzima que presentan o muestran especificidad por el mismo sustrato, o comparten la misma función catalítica.

Las aloenzimas son isoenzimas cuyas variantes son codificadas por diferentes alelos dentro del mismo locus (Chang y Ko, 1991; Reis *et al.*, 2000).

El análisis de isoenzimas ofrece medios selectivos para la identificación de niveles de variación genética en las poblaciones. La expresión de los alelos que cifran para los isoenzimas por lo general no está influenciado por el ambiente. Si la información de los loci de las isoenzimas proporciona estimaciones imparciales de la variación genética de la población, entonces los efectos de la recombinación sexual en una población pueden ser detectados mediante los datos de las isoenzimas. Se conoce mucho sobre la base genética de los fenotipos comúnmente observados de las isoenzimas, el análisis de las isoenzimas permite a menudo el análisis genotípico así como frecuencias fenotípicas en poblaciones. Si la recombinación sexual ocurre con frecuencia en una población, una gama más amplia de genotipos se puede observar concerniente a una población asexual. Si ocurre el acoplamiento al azar las frecuencias genotípicas pueden darse con las esperadas (Tooley, *et al.*, 1985).

2.3.1.1 Análisis de Peptidasa (Pep)

El análisis con isoenzimas puede confirmar la evidencia de diploidias en *Phytophthora infestans* mediante la revelación de bandas observadas con patrones específicos para su análisis (Tooley *et al.*, 1985; Sansome, *et al.*, 1973; Shaw, 1983; Khaki, 1971).

Los patrones encontrados en el análisis de peptidasa son similares a los de Gpi, (100/100, 96/100, 76/100), estos valores se determinan viendo la distancia de migración de las bandas producidas en el gel, es decir su movilidad electroforética, debido a que estas enzimas son diméricas y están presentes en un organismo diploide se esperan tres bandas o alelos para individuos heterocigotos y una sola para individuos homocigotos, a manera de ejemplo un individuo con genotipo 100/100 va a tener una sola banda definida mientras que un individuo con genotipo 76/100 tiene el alelo 100 en la parte de abajo, el alelo 90 en la parte superior y entre los dos un heterodímero que es el resultado de la unión de ambos alelos (Tooley *et al.*, 1985; Reis *et al.*, 2000).

2.3.1.2 Análisis de Glucosa-6-fosfato isomerasa (Gpi)

La Glucosa-6-fosfato isomerasa juega un papel importante en la ruta del glucólisis y la glucogénesis. Esta enzima se la utiliza como un patrón para la caracterización de *Phytophthora infestans* (Ospina, 2003).

Para el análisis se han revelado al menos 6 genotipos diferentes en las poblaciones de *Phytophthora infestans*, los cuales son conocidos como 83/100, 86/86, 86/100, 100/100, 100/122, y 122/122. Cada alelo es nombrado de acuerdo a la movilidad electroforética de la isoenzima que codifica en relación con la más común conocida como 100 (igual al análisis de Pep), los cambios en GPI pueden ser un importante factor en la variación del patógeno, en especial para la detección de aislados más virulentos (Ospina, 2003; Reis *et al.*, 2000).

2.3.2 Técnicas a nivel molecular

2.3.2.1 Microsatélites

Los microsatélites son secuencias simples de DNA que se repiten en el genoma se los llama también secuencias simples repetitivas (SSR), las cuales contienen de 1 a 4 nucleótidos que se repiten en bloque, que generalmente presentan loci genético altamente polimórficos.

Este tipo de secuencias varía entre animales y vegetales, por ejemplo en los mamíferos las secuencias más comunes son (GT) n y (CA) n , donde n representa el número de veces que se repite la secuencia. En plantas, las secuencias más comunes son (AA) n y (AT) n . En el caso de *Phytophthora infestans* una de las secuencias mas frecuente es (TC).

Los microsatélites pueden ser amplificados vía PCR, utilizando un par de "primers" especialmente diseñados (de 20-30 bases), complementarios a las secuencias únicas que flanquean los microsatélites. La base molecular de polimorfismo radica en la diferencia del número de unidades repetitivas en los diferentes loci de microsatélites, cada segmento, de tamaño diferente (amplificado generalmente desde varias decenas hasta centenas de pares de bases) representa un alelo diferente de un locus (Dobrowolski, 2002).

A los microsatélites se los ha escogido para análisis moleculares debido a que poseen gran polimorfismo (altamente informativos), son codominantes (permite diferenciar entre homocigotos y heterocigotos), se encuentran dispersos en

diferentes partes del genoma poseyendo un alto número de copias, es decir reúnen todas las características para ser utilizados como marcadores (Roca y Ramirez, 1999; Creste, 2001).

2.3.2.2 DNA Mitocondrial

El DNA mitocondrial (mtDNA) es un material genético circular cerrado de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias celulares, es importante para la caracterización de poblaciones debido a que mediante su estudio se puede reconstruir el pasado reciente por su herencia materna.

Esta técnica se utiliza generalmente para la descripción de migraciones de la especie, debido a que solo existe una herencia materna para la determinación de haplotipos o tipos de DNA mitocondrial en *Phytophthora infestans*, Para identificar los distintos haplotipos se utiliza la técnica de PCR-RFLP.

El estudio se basa en el análisis de un fragmento del DNA mitocondrial, que al ser digerido por una enzima específica, y visualizada en un gel de agarosa al 2%, se pueden identificar los diferentes haplotipos existentes en el patógeno de estudio. En *Phytophthora infestans* se han designado 4 haplotipos mitocondriales a nivel mundial (Ia,IIa,Ib,IIb) (Carter *et al.*, 1990; Maldonado *et*

al., 1999, Griffith and Shaw, 1998) y recientemente se descubrió uno nuevo (Ic) en Ecuador (Ordóñez *et al.*, 2000).

2.3.2.3 Polimorfismo de la longitud de los Fragmentos de restricción (RFLP)

La técnica de los RFLP fue descrita por primera vez en el año de 1980. En la actualidad ocupa un rol muy importante en estudios sobre genética humana y sobre todo para estudios moleculares en la investigación de *Phytophthora* con la prueba de RG57 (Tanksley, 1989; Pérez, 1998; Knapova, 2001).

Se basa en la detección de fragmentos de DNA de distinto peso molecular en diferentes organismos. Los fragmentos más fáciles de analizar son (los pequeños) los derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o los cloroplastos puesto que delecciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente el patrón de bandas identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde migran de acuerdo con su peso molecular. En cambio, para moléculas de DNA de mayor tamaño, como el DNA cromosómico, el patrón de bandas es tan complejo que es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de Southern Blot (Raise, *et al.*, 2000). Las sondas de DNA para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan DNA preparados a partir de amplificaciones inespecíficas. Aunque la RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo en cada ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas geonómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la

frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP (Kimball, 2005).

Capítulo 3:

METODOS

3.1 Extracción y conservación de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó el protocolo descrito por el CIP-Quito (1999). Aproximadamente 5 mg de micelio previamente liofilizado y macerado fue homogenizado con 1ml de buffer de extracción (Sorbitol 140mM, Tris HCl, Ph 8 220mM, EDTA 22mM, NaCl 800mM, CTAB 0.8%, Sarkosyl 1%), al cual se le añade 0.5 ml de cloroformo alcohol isoamilico (24:1), las muestras fueron incubadas a 58°C por 30 minutos invirtiendo los tubos cada 10 minutos, a estos se los hace reposar hasta que tomen temperatura ambiente por 5 minutos y luego se centrifugan a 14000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante es transferido a un tubo limpio y estéril, y se le añade 1 a 1.5 vol de isopropanol, se los deja reposar en hielo durante 30 minutos y se centrifugan a 14000rpm durante 3 minutos. Se descarta el sobrenadante y se hacen tres lavados con etanol al 70% al pellet, se deja secar de 20 a 25 minutos y posteriormente se los disuelve en 100µl de RTE (Trizma Base 10mM, EDTA 0.1mM pH final 8), y 2µl de RNAsa (10mg/ml), se deja que la RNAsa actue por 30 minutos y se mide la concentración del DNA.

Para medir la calidad y concentración final del DNA se utilizó el método de observación, en el cual se utiliza un marcador de concentración denominado low mass ladder, este posee 6 bandas con valores iguales a 50, 30, 20, 10, 5 y 2.5 las bandas con concentraciones mas altas serán mas gruesas e intensas, mientras la concentración de las mismas va disminuyendo estas serán menos

intensas y menos gruesas, a estas se las compara con el producto obtenido y se estima un valor de concentración en dependencia de su intensidad y grosor.

3.2 Marcadores Moleculares

3.2.1 Antecedentes

Los marcadores moleculares están relacionados con los linajes clonales. Se han definido tres tipos de marcadores moleculares para *Phytophthora infestans* el tipo de apareamiento (A1 o A2), los loci de isoenzimas Glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*), Peptidasa (*Pep*), el haplotipo mitocondrial (mtDNA) y el DNA fingerprinting (RFLP) (Spielman *et al.*, 1991).

El numero de técnicas que en la actualidad se utilizan para la identificación y caracterización de especies es muy numerosa y va incrementando conforme avanza el tiempo. La mayoría de estas técnicas se basan en el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que fue descrita en 1988. La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del DNA molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su DNA molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo DNA entre los dos oligonucleótidos. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo. Hoy en día todo el proceso esta completamente automatizado en un aparato llamado termociclador (Claros, 2002).

Para la caracterización de *Phytophthora infestans* se utilizan tanto las técnicas a nivel enzimático como las técnicas a nivel molecular, que se describen a continuación:

3.3 Técnicas a nivel enzimático

El análisis de isoenzimas puede proporcionar marcadores genéticos valiosos para el uso de los mismos en los estudios futuros en *Phytophthora infestans*. El uso de este tipo de marcadores es de gran valor debido a que se pueden distinguir individuos homocigotos como heterocigotos, además que los patrones de bandas no son afectados por factores ambientales. La ventaja de este tipo de técnicas es que son fáciles de interpretar, y de utilizarse además de su codominancia.

3.3.1 Análisis de Pep (peptidasa)

Para el análisis de Pep se siguió el protocolo descrito en el manual de Laboratorio para *Phytophthora infestans* CIP-Quito (1999), donde los genotipos se designan con dos valores, representando la distancia de migración en el gel (Forbes *et al.*, 1997a).

La extracción de proteínas se realizó partiendo de micelio liofilizado, el cual fue disuelto y homogenizado con la solución de extracción (800µl de TC-7, 150µl de sucrosa 40%, 50µl de bromofenol, 50µl de xilencianol), Luego se centrifugó por 2 minutos a 10.000rpm, y se guardó las muestras a 4°C para su posterior uso.

El gel fue previamente preparado tanto el de resolución como el de apilamiento con acrilamida-bisacrilamida a diferentes concentraciones para cada uno de ellos. Las muestras fueron cargadas con 20ul por posillo, y el voltaje aplicado fue de 12-15 V durante 6 horas.

Para revelar los geles, se utilizó el método de tinción directa, el cual consta de los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Volumen
Tris-HCl pH8	0.05 M	2 ml
Glicil-leucina	15 mg/ml	10 gotas
Peroxidasa	1000 U/ml	5 gotas
o-Dianicidina	4 mg/ml	8 gotas
MnCl ₂	20 mg/ml	2 gotas
a-aminoacido oxidasa	10 U/ml	5 gotas
Agar	1,4 %	2 ml

El agar se lo utiliza para que los reactivos se solidifiquen sobre el gel y se produzca la reacción específica para esa enzima, condición que se da incubando el gel a 37°C.

3.3.2 Análisis de Gpi (glucosa-6-fosfato isomerasa)

Para el análisis de Gpi, se siguió el protocolo establecido por Spielman, *et al* (1991) el cual se encuentra descrito en el manual de laboratorio para *Phytophthora infestans* de CIP, donde se utilizan geles de almidón.

La extracción de proteínas se realizó partiendo de micelio liofilizado, el cual fue disuelto y homogenizado con la solución de extracción (50µl de TC 7). Luego se centrifugó por 2 minutos a 10.000rpm, y se guardó las muestras a 4°C hasta su posterior uso.

Previamente se preparó el gel con almidón de papa (28gr/lit de buffer), antes de colocar las muestras se cortó el gel en la parte superior abriendo los dos lados y se colocó las muestras con unas mechas de papel absorbente (4 x 7 mm). El gel se corre de 15-21 V durante toda la noche.

Para la resolución del gel se utilizó el método de tinción directa que consta de los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Volumen
Tris-HCl pH8	0.05 M	1.5 ml
Fructosa-6-fosfato	20 mg/ml	5 gotas
NAD	3 mg/ml	1 ml
MTT	10 mg/ml	5 gotas
PMS	2 mg/ml	5 gotas
Glucosa-6-fosfato		
deshidrogenasa	1 U/ml	2 µl

Agar	1,4 %	2 ml
------	-------	------

El gel se debe cortar debido a que las muestras se encuentran en el centro del mismo y luego se lo tiñe.

3.3.3 Técnicas a nivel molecular

3.3.3.1 Microsatélites

Tras probar algunos métodos obtenidos por el CIP y la revisión de la literatura, se procedió a estandarizar el método para el análisis de microsatélites y a escribir un manual de usuario que se encuentra descrito en el anexo 1.

Para la amplificación de las muestras se cambió la temperatura de anillamiento y el número de ciclos, con el fin de mejorar la calidad del producto obtenido al momento de revelar el gel.

3.3.3.2 DNA Mitocondrial

Se determinó primero los pares de primers que se utilizaron en base a la literatura consultada y se llegó a la conclusión de que los pares 2 y 4 son más informativos debido a que pueden diferenciar el haplotipo Ic descubierto en Ecuador (Ordóñez, *et al.*, 2000).

Adicionalmente se realizó una amplificación del DNA mitocondrial, sobre la región P2 mediante los primers F2(5'TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT3') y R2 (5'TTACGGCGGTTTAGCACATACA3') y la región P4 mediante los primers F4 (5'TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT3') y R4

(5'CCGATACCGATACCAGCACCAA3'). La reacción PCR se realizó preparando el coctel con los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua		13.2 μ l
Buffer 10X	10 X	2.5 μ l
MgCl ₂	3 mM	3 μ l
dNTP's	10 mM	1 μ l
Primers	20 mM	0.5 μ l
Taq Polimerasa	0.06 U	0.3 μ l
DNA	5 ng/ul	4 μ l

El volumen final para cada muestra fue de 25 μ l que seguidamente utilizó el siguiente programa.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	94	1 min 30 seg
2	94	40 seg
3	58	55 seg
4	72	1 min 30 seg
5	a 2*41v	
6	72	5
7	4	∞

El programa fue modificado para que el producto final sea más intenso, aumentando el número de ciclos y disminuyendo la temperatura de annealing.

Una vez amplificadas las muestras, se procedió a digerir con enzimas de restricción específicas para cada par de primers, utilizando para el producto de la región P4 la enzima EcoR1 (CAATTG) y para el producto de la región P2 la enzima Msp1 (CCGG). Los productos fueron digeridos durante 6 horas utilizando la siguiente reacción:

Reactivo	Volumen
H ₂ O	12.3 μ l
10X Buffer	2 μ l
BSA	0.2 μ l
Enzima _(10u/ul)	0.5 μ l
Vol mix	15 μ l
DNA amplificado	5 μ l

El volumen final para cada muestra es de 20 μ l. Los fragmentos fueron separados en geles de agarosa al 2% y visualizados sobre un transiluminador con luz ultravioleta. Las digestiones producen bandas con los siguientes pesos: (Ordóñez, *et al.*, 2000).

Primers	Producto PCR	Enzima	Fragmento (bp)
---------	--------------	--------	----------------

			IA	IB	IIA	IIB	Ic
F2/R2	1070	Msp1	720	641	720	720	720
			350	350	203	350	125
				79	147		100
F4/R4	964	EcoR1	394	394	603	603	209
			361	361	361	361	750
			209	209			

3.3.3.3 RFLP

Para este tipo de análisis se necesita DNA de muy buena calidad y en cantidades grandes, es por esta razón que primero se realizó la concentración del DNA colocando isopropanol en una relación 0:7:1 con respecto al volumen de DNA, se lo guarda a -20°C durante 1 hora se centrifuga durante 1 min. A 14000rpm, El sobrenadante se desechó y se redisolvió el precipitado en 30 μ l de RTE, esto se hace para obtener una cantidad igual a 2000ng, en un volumen menor para que alcance la muestra en los posillos.

Una vez terminado este procedimiento se digirió las muestras con la enzima EcoRI que a continuación se detalla:

Reactivo	Volumen
H2O	3.8 μ l
10X Buffer	4 μ l

Espermidina	1 μ l
Enzima _(10u/ul)	1.2 μ l
Vol mix	10 μ l
DNA	30 μ l

El volumen final para cada muestra es de 40 μ l . Se cargaron las muestras en un gel de agarosa al 0.8% y buffer TBE 1X, se corrió el gel en voltaje constante a 55V durante 24 horas. Los resultados se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta. Se comprobó que el DNA esté completamente fragmentado (como si se hubiera degradado). Una vez terminado este paso se procedió a cortar el gel del tamaño de la membrana al que va a ser traspasado.

El gel debe ser Depurinizado con HCl 0.25 M por 8 minutos, deshibridizado en una solución de NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M por 30 minutos (dos lavados de 15 min) y finalmente neutralizado con una solución de Tris/HCl 0.5 M pH 7.5 y NaCl 1.5 M por 15 minutos.

Para realizar Southern Blot, se utilizó 20X SSC (Citrato de Sodio 88.2 gr NaCl 175.3 gr (3M) ajustado a pH 7 en un litro de solución). El gel tiene que ser colocado boca abajo debido a que el DNA tiende a acumularse en el fondo. Sobre el gel se colocó la membrana con mucho cuidado para evitar la transferencia irregular y encima de esta una pila de papel absorbente con un peso aproximado de 500 gr. El proceso dura 16 horas, al día siguiente una vez

finalizado el blot se retiraron los objetos colocados sobre la membrana, la misma que tiene que ser lavada en una solución de 5X SSC para retirar el exceso de sales. Se dejó secar al ambiente por 10 minutos, se colocó en la estufa por 2 horas a 80°C para que el DNA sea fijado en la membrana y se guardó la membrana a 4°C dentro de una funda hermética.

Para la hibridación de las membranas se procedió a:

Prepar el buffer de hibridación, el mismo que tiene que estar una hora en agitación y una hora en incubación, una vez terminado este proceso se prehibridaron las membranas 42°C.

Para la marcación de la sonda se diluyó la sonda RG57 junto con el ladder (la concentración dependerá de la cantidad de DNA que se utilizó, por cada 3ug serán 10ng de sonda). Se desnaturalizó el DNA a 98°C por 5 minutos, se enfrió de inmediato a 0°C por 5 minutos, se centrifugó y adicionó un volumen igual de la solución labeling (peroxidasa), luego se colocó el mismo volumen de glutaraldehído y se incubó la sonda a 37°C por 20 minutos.

Se adicionó la sonda al buffer de hibridación, se incubaron las membranas a 42°C por 16 horas, se lavaron las membranas con 500ml de buffer primario(367.347gr de urea, 4gr de SDS y 15ml de SSc 0.3X) por 20 minutos a 42°C, después con el buffer secundario(100ml SSC20X en 1 lt) por 5 minutos y se cargaron los cassettes con placas de revelado en oscuridad, se detectó la señal mezclando los dos buffers (15 ml de cada uno) de detección por un

minuto, se envolvió la membrana en un Saran FRAP y se colocó la membrana en contacto con la placa.

Para el revelado se sumergió la membrana en el buffer revelador (30ml de stock comercial Kodac en 1 lt) por 2 minutos o hasta que sea visible la señal. Se lavó en agua por 30 segundos, se sumergió la placa en el buffer de fijación por 10 minutos con agitación constante, se lavaron las placas en agua por alrededor de 1 minuto y se colgaron las placas para que se sequen.

Las membranas pueden ser guardadas en una funda sellada a 4°C por tiempo indefinido.

Análisis Estadístico:

Para determinar el tipo de segregación en los diferentes cruces, se utilizó la prueba de ji cuadrado debido a que el número de muestras para el análisis no es muy grande (esto es uno por cada familia, es decir 11 análisis), donde la proporción esperada es 1:1:1:1 y se la compara con las frecuencias observadas de cada familia tanto para los resultados del análisis de Pep y Gpi, la fórmula que se utiliza es la siguiente:

$$G = \sum \frac{(o - e)^2}{e}$$

o= Frecuencia observada

e= Frecuencia esperada

y se la compara con los valores tabulares de la tabla de ji-cuadrado con k-1 grados de libertad con error de 0.05 y 0.01.

Para la medición de las relaciones genéticas (distancias genéticas y los coeficientes de similitud) se utilizó el programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) version 2.0.

Antes de ingresar los datos al programa NTSYS se generó una matriz que describe la presencia y ausencia de las bandas (1:0). La información de las bandas y no bandas son obtenidas de todos los análisis realizados a la progenie (Anexo 5). Una vez que se introdujo la matriz (previamente realizada) en el programa esta se la analizó utilizando el test de Jaccard para finalmente obtener el UPGMA.

La fórmula de Jaccard es la siguiente:

$$C_{jk} = \frac{a}{a + b + c}$$

a= 1.1

b=1.0

c=0.1

La matriz producida a partir de Jaccard es utilizada para la creación de los dendogramas, por el método de agrupamiento con pares no balanceados (UPGMA).

Capítulo 4:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

Tras haber analizado 120 individuos se obtuvo un total de 111 genotipos distintos tomando en cuenta todos los marcadores como se muestra en el árbol de distancias genéticas (Anexo 3), los mismos que variaron en frecuencias 1 a 0.30, para la descripción de los árboles de distancias génicas realizados individualmente por familias y grupos de las mismas, se tomó un rango comprendido entre 0.50 y 0.69 (formación de grupos).

La naturaleza co-dominante de los marcadores SSR permitió estudiar la segregación de cada locus de manera independiente, debido al análisis con 3 pares de primers las probabilidades de recombinación aumentaron, dando genotipos únicos, que segregaron de forma independiente. En La mayoría de se encontraron tres haplotipos mitocondriales (IA, IIA y Ic) siendo la mayoría de estos del tipo Ic (encontrado en Ecuador).

Tomando en cuenta el análisis estadístico (prueba ji cuadrado) de Pep y Gpi se determinó que las familias con mayor número de progenie tienen resultados significativos en comparación con las familias con poca progenie que presentaron resultados no significativos, para el caso del análisis de Gpi se determinaron 2 familias (27 y 42) que no siguen una proporción mendeliana y el resto de familias si, no se explica la diferencia con la prueba de Pep que generó un 50% de familias que segregaron de forma mendeliana y el otro 50% no. (Tablas 4.1.1 y 4.1.2).

A continuación se detallan los resultados de Pep, Gpi, y DNA mitocondrial por familia, los dendogramas de distancias genéticas se realizaron utilizando todos los marcadores expuestos anteriormente, los mismos que se agruparon en relación del número de progenie.

Los genotipos identificados para la prueba de Pep se encuentran en la figura 4.1, Gpi en la figura 4.2 y DNA Mitocondrial se muestran en las figura 4.3.

No se detallan los resultados del análisis de microsatélites en cada una de las familias debido a que este resultó ser muy informativo, sino que se realizó un cuadro de resultados con los pesos de los alelos correspondientes a toda la

progenie (anexo 2), se puede observar que cada uno de los padres poseen tres alelos característicos para el primer 4B y 1F y uno o dos para el 2D, la combinación de alelos es muy variada debido a que casi todos los hijos son únicos, en especial para el primer 4B seguido del 1F y 2D en orden de la cantidad de información dada.

Para el análisis de microsatélites y RFLP se detallan mejor los resultados en la tabla que se encuentra en el anexo 2, los genotipos encontrados para el análisis de microsatélites se encuentran en la figura 4.4 y RFLP se encuentran en la figura 4.5

El listado de las familias analizadas se encuentra descrito en el anexo 4.

Familia 18: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3823 (A1) y 3828 (A2), su progenie es de 4 hijos, para el análisis de Pep se determinaron los valores 76/100 tanto de los padres como de los hijos, en el análisis de Gpi el patrón dominante fue 86/100 correspondiente al padre A2, ningún hijo obtuvo el patrón 100/100 correspondiente al padre A1 y el haplotipo dominante fue el IA para el análisis de DNA mitocondrial igual al del padre A1, ningún hijo heredó el haplotipo Ic.

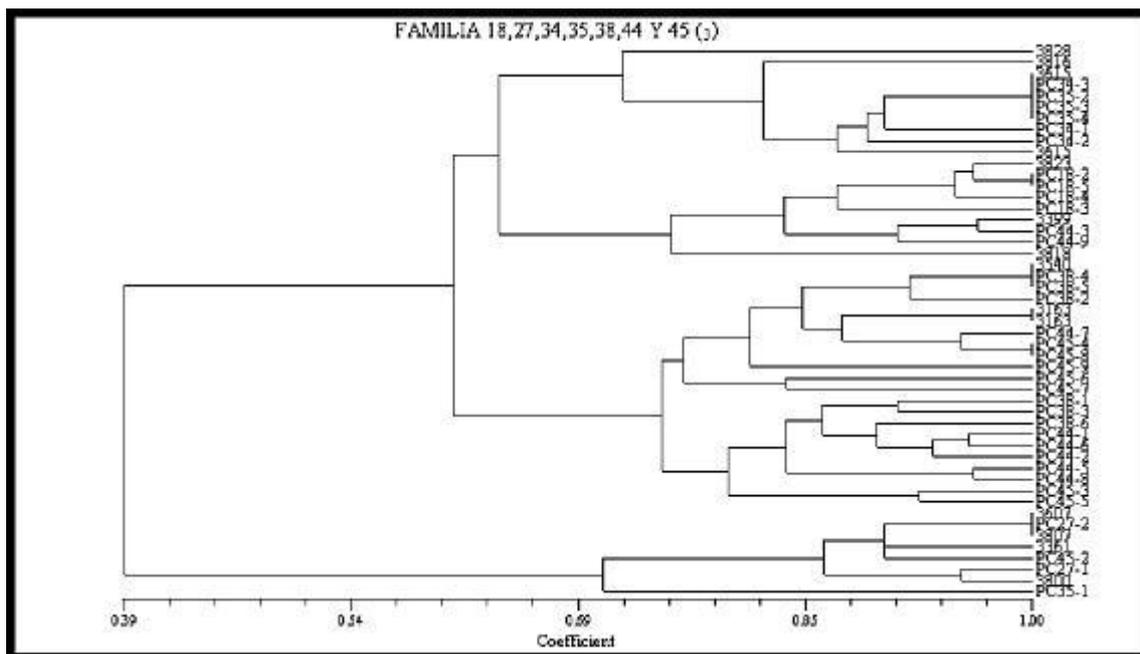


Figura 4.1. 1 Dendrograma de distancias genéticas correspondiente a las familias 18, 27, 34, 35, 38, 44 y 45, realizado con todos los marcadores utilizados en la caracterización de la progenie utilizando el test de Jaccard.

Familia 27: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3607 (A1) y 3816 (A2), su progenie es de 2 hijos, para el análisis de Pep se determinaron los valores 76/100 para el un hijo y 96/100 para el otro, en el análisis de Gpi el patrón dominante fue 90/100 correspondiente al padre A1, ningún hijo obtuvo el patrón 100/100 correspondiente al padre A2 y el haplotipo dominante fue el IIA para el análisis de DNA mitocondrial igual al del padre A1, ningún hijo heredó el haplotipo Ic.

Familia 29: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3531 (A1) y 3785 (A2), su progenie es de 7 hijos, para el análisis de Pep se determinaron los valores 76/100 para los hijos 2 y 7 (correspondiente al padre

A2), 100/100 para los hijos 4, 5 y 6 (no correspondiente a ninguno de los padres) y 96/100 para los hijos 1 y 3 (correspondiente al padre A1), en el análisis de Gpi el patrón dominante (con 5 hijos) fue 90/100 correspondiente al padre A1, 2 hijos obtuvieron el patrón 86/100 correspondiente al padre A2 y el haplotipo dominante fue el IIA (con 6 hijos) para el análisis de DNA mitocondrial igual al del padre A1, el hijo 7 heredó el haplotipo Ic.

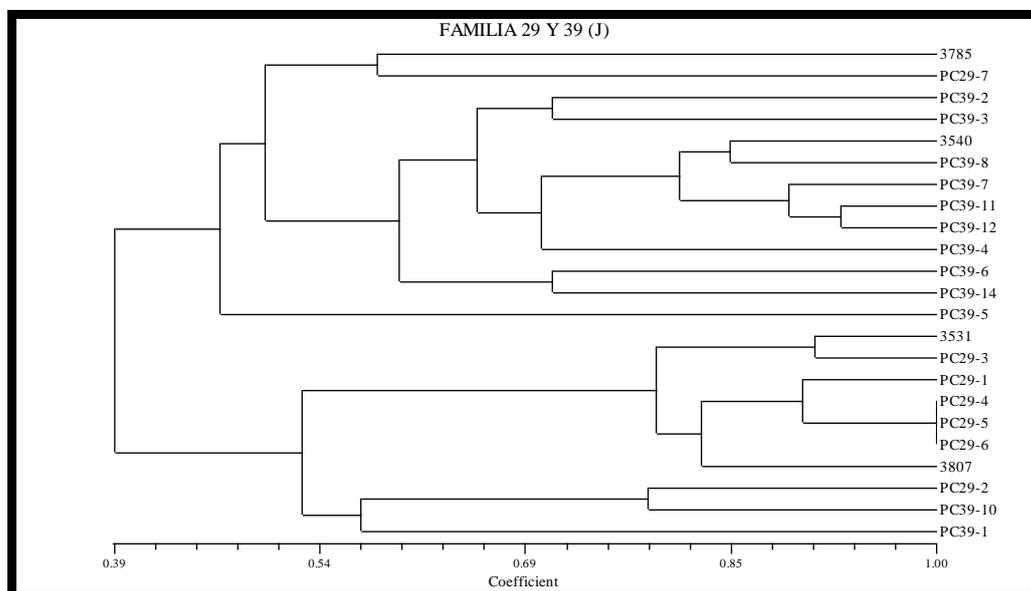


Figura 4.1. 2 Dendrograma de distancias genéticas correspondiente a las familias 29 y 39, realizado con todos los marcadores utilizados en la caracterización de la progenie utilizando el test de Jaccard.

Familia 34: Los padres 3615 (A2) y 3807 (A1) tienen los siguientes patrones para análisis de Pep 76/100 y 96/100 respectivamente, la progenie es de 3 hijos, toda la progenie tiene un patrón dominante que es el 76/100, sucede lo mismo para el caso del DNA Mitocondrial, el haplotipo dominante es el Ic en

toda la progenie, siendo los padres Ic (3615) y IIA (3807), para el análisis de Gpi se determinaron 2 hijos con patrón 90/100 y uno con 100/100.

Familia 35: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3800 (A1) y 3615 (A2), su progenie es de 4 hijos, para el análisis de Pep se determinaron los valores 76/100 para 3 de sus hijos y 96/100 para uno de sus hijos, en el análisis de Gpi el patrón dominante fue el 90/100 correspondiente al padre A1, el hijo 1 obtuvo el patrón 100/100 correspondiente al padre A2 y el haplotipo dominante fue el Ic para el análisis de DNA mitocondrial igual al del padre A2, ningún hijo heredó el haplotipo IIA.

Familia 37: Los padres 3541(A2) y 3807(A1) tienen el patrón 76/100 y 96/100 respectivamente, la progenie es de 22 hijos, para el análisis de Pep, en esta familia el patrón dominante fue en la mayoría 76/100, a excepción del hijo 4 con un patrón 96/100, y el hijo 13 con un patrón de 100/100, para el análisis del DNA mitocondrial la mayoría de la progenie presentó el haplotipo Ic, igual al de su padre A2 a excepción del hijo 20 con haplotipo IIA igual al de su progenitor A1, en el caso de Gpi la dominancia es de 100/100 siendo apenas 5 hijos de la progenie que heredaron el 90/100.

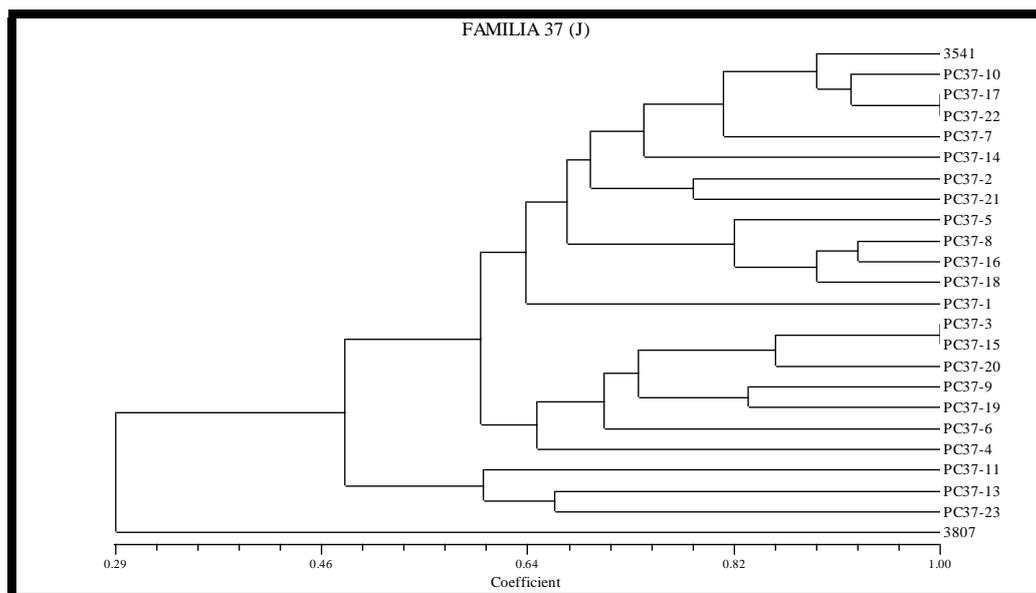


Figura 4.1. 3 Dendrograma de distancias genéticas correspondiente a la familia 37, realizado con todos los marcadores utilizados en la caracterización de la progenie utilizando el test de Jaccard.

Familia 38: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3540 (A2) y 388 (A1), su progenie es de 6 hijos, para el análisis de Pep se determinaron los valores 76/100 tanto de los padres como de los hijos, en el análisis de Gpi el patrón dominante fue el 100/100 correspondiente a toda la progenie con sus padres y el haplotipo dominante fue el Ic para el análisis de DNA mitocondrial igual al del padre A2, ningún hijo heredó el haplotipo IA.

Familia 39: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3540 (A2) y 3807 (A1), su progenie es de 12 hijos, para el análisis de Pep el patrón dominante fue el 76/100 correspondiente al padre A2, a excepción del hijo 8 con un patrón 96/100 igual al del padre A1, los haplotipos determinados fueron

IIA y Ic para los padres 3807 y 3540 respectivamente, la progenie en su mayoría presento el haplotipo Ic con excepción de los hijos 1, 4 y 10 que presentaron el haplotipo IIA, Para Gpi se ve dominancia en el patrón 100/100 habiendo dos hijos heredado el patrón 90/100.

Familia 42: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3260 (A2) y 3802 (A1), su progenie es de 40 hijos, para el análisis de Pep la mayoría de la progenie presentó el patrón 76/100 correspondiente al padre A2, con excepción de los hijos 14, 20 y 24 que presentaron un patrón de 96/100 igual al de su padre A1, con respecto a su DNA mitocondrial en su mayoría tuvieron haplotipo Ic, con excepción de los hijos 17, 18, 19, 23, 24, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38 y 39 con haplotipo IIA igual al de su padre A1, para el caso de Gpi el patrón dominante fue 100/100 habiendo 8 hijos que heredaron el patrón 90/100.

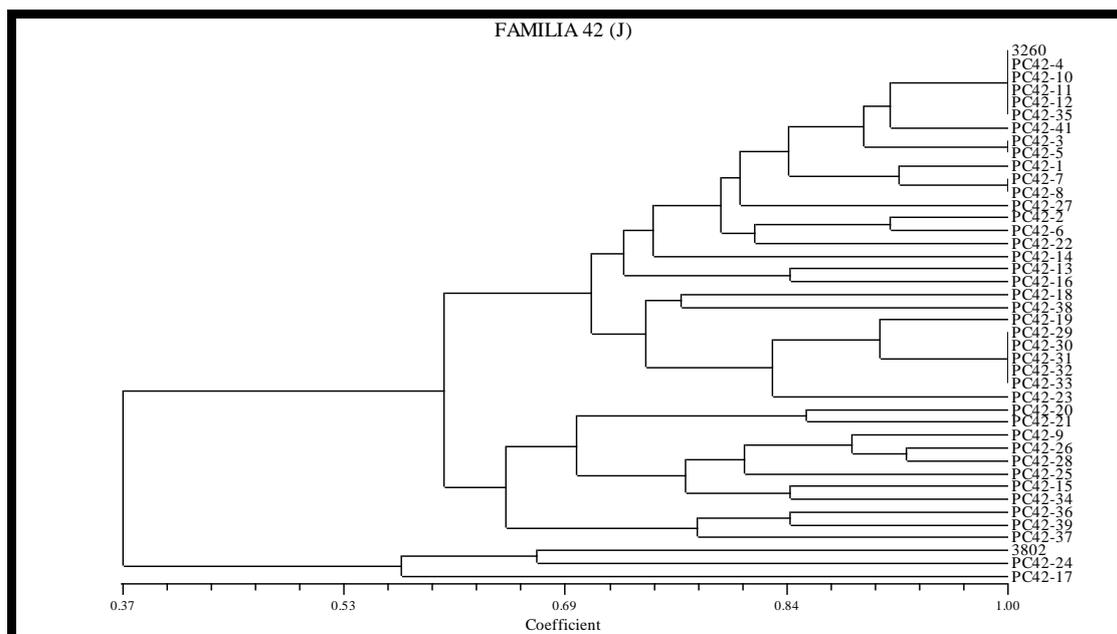


Figura 4.1. 4 Dendograma de distancias genéticas correspondiente a la familia 42, realizado con todos los marcadores utilizados en la caracterización de la progenie utilizando el test de Jaccard.

Familia 44: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3163 (A2) y 3399 (A1), su progenie es de 8 hijos, para el análisis de Pep tanto los padres como los hijos tuvieron el patrón 76/100, lo mismo sucede con el análisis de Gpi heredando todos el patrón 100/100 tanto del progenitor A1 como A2, y el haplotipo dominante fue el Ic para el análisis de DNA mitocondrial, a excepción del hijo 3 que presentó el haplotipo IA correspondiente a su padre A1.

Familia 45: Los padres correspondientes a esta familia son los aislados 3163 (A2) y 3361 (A1), su progenie es de 8 hijos, para el análisis de Pep el patrón dominante fue 76/100 correspondiente al padre A2 con excepción del hijo 2 con patrón 96/100 igual al de su padre A1, algo parecido sucede con el análisis de Gpi heredando la mayoría el patrón 100/100 correspondiente al padre A2, tres hijos heredaron el patrón 90/100 igual al de su padre A1, y el haplotipo dominante fue el Ic para el análisis de DNA mitocondrial, a excepción del hijo 2 que presentó el haplotipo IIA correspondiente a su padre A1.

4.2 Discusión

ANALISIS POR FAMILIAS

FAMILIA 37:

Para este caso se analizaron 22 individuos, en la figura 4.1. 3 se observa la alta homogeneidad presente en la familia, y a la vez cuatro grupos claramente definidos como se muestra en el dendograma, se ve que existe gran similitud entre los aislados 17 y 22 por un lado (con valor igual a 1), 3 y 15 por otro (igualmente con valor igual a 1) que en este caso serian genotipos idénticos o clones, el padre 3807 es totalmente diferente a toda su progenie debido a que forma un grupo siendo el único en comparación con el resto de la progenie que tiene cierta similitud, se ve que un porcentaje no muy grande tiene un parecido al padre 3541, y a su vez gran parte de la progenie (91.7%) es híbrida al presentar genotipos únicos, con esto se demuestra que el patógeno tiene un alto porcentaje de hibridación, que pueden o no generar genotipos mas agresivos (Gavino, *et al.*, 2000).

FAMILIA 42:

Para este caso fueron estudiados 40 individuos, en el dendograma de la figura 4.1. 4 se presentan dos grupos muy definidos, siendo el uno pequeño y el otro se subdivide a su vez en dos subgrupos, en esta familia se encuentra algunos grupos de individuos iguales como es el caso de los hijos 29,30,31,32 y 33,(grupo 1) 7 y 8 (grupo 2) 3 y 5 (grupo 3) y 3260, 4, 10, 11, 12 , 35 como grupo 4 de este ultimo grupo se puede establecer que los cinco hijos presentaron genotipos iguales al de su padre 3260 siendo clones del mismo, a su vez se presenta un porcentaje de hibridismo del 73,8%, con estos resultados

no se descarta la posibilidad de que el patógeno pueda adaptarse a varios hospederos diferentes a los de sus progenitores (Brasier, *et al.*, 1999).

FAMILIA 29 Y 39

Para este caso fueron estudiados 19 individuos, hay que recalcar que se los agrupo de esta forma debido al número de hijos que tenía cada una de las familias: 12 para la familia 39 y 7 para la familia 29. Como nos podemos dar cuenta en el dendograma de la familia 4.1. 2 existen 3 subgrupos que se dividen de uno, el que se ubica en el centro contiene gran parte de la familia 29, y los de los extremos forman parte de la familia 37, se ve similitud con los aislados 29-4, 29—5 y 29-6 los cuales tienen un parecido con su padre 3531, por lo demás el resto de progenie presenta genotipos únicos independientemente de la familia a la que pertenecen, se ve también que los aislados 29-2 y 29-7 presentan características similares a los de la familia 39, se encontró un porcentaje de hibridismo igual al 91.3%.

FAMILIA 18, 27, 34, 35, 38, 44 Y 45:

Estas familias fueron agrupadas debido a que cada una tenía poca cantidad de progenie variando entre 2 y 8, en el dendograma de la figura 4.1. 1 se observan tres grupos bastante definidos, ubicando a las familias como el caso de la 27 y 18 bastante unida o similar, se observan individuos con similitud igual a un padre de su familia y otro de familia diferente como es el caso de los

individuos 3607, 27-2 y 3807 siendo solo el aislado 3607 uno de los progenitores, se determina varios clones algunos iguales a un padre y otros agrupados entre si como es el caso de los grupos (45-4 y 45-8), (3540, 38-4 y 38-5), (18-2 y 18-5) y (3615, 34-3, 35-2, 35-3 y 35-4), se puede ver a su vez que cada subdivisión agrupa a los aislados por familias, con algunas excepciones, se puede observar la existencia de una relación entre las familias 44 y 45, y a su vez con las familias 34 y 35.

ANALISIS DE RFLP

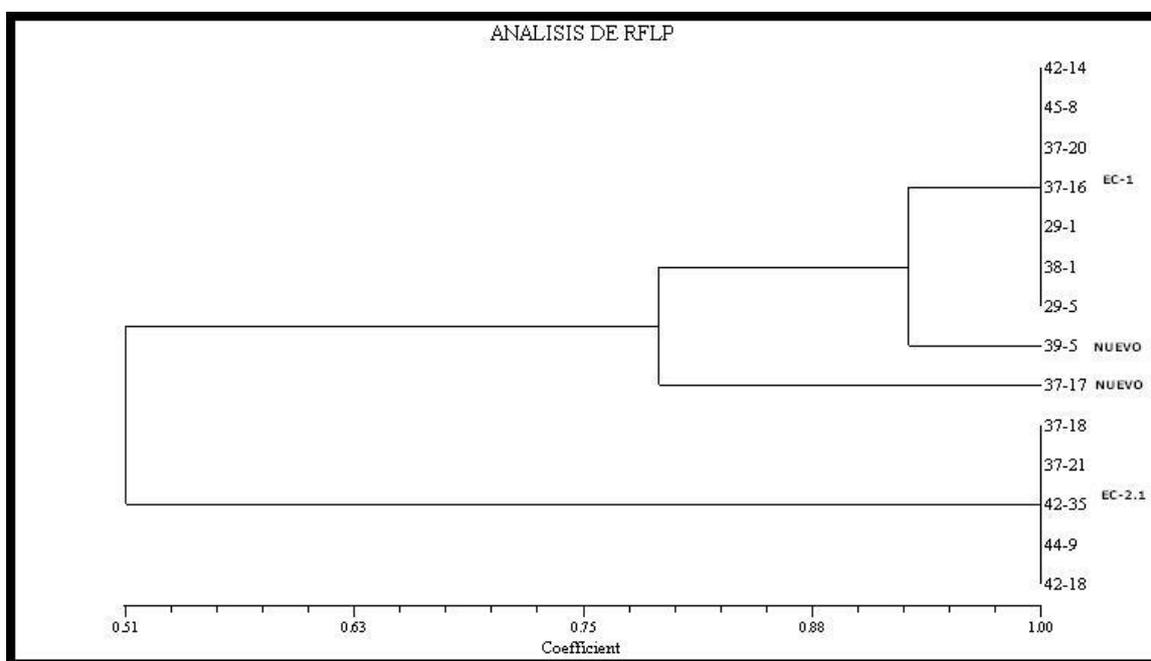


Figura 4.2. 5 Dendrograma de distancias genéticas correspondiente al análisis de RFLP utilizando el test de Jaccard.

Catorce individuos fueron seleccionados para el análisis con RFLP, los individuos 42-14, 45-8, 37-20, 37-16, 29-1, 38-1 y 29-5 tuvieron linaje EC-1, los individuos 37-18, 37-21, 42-35, 44-9 y 42-18 con linaje EC2.1, existieron dos nuevos linajes correspondientes a los individuos 39-5 y 37-17, los cuales

tuvieron ausencia de algunas bandas como son la banda 8,9 12, 14^a, 18,21 y 24, en el aislado 37-17 aparece una banda mas intermedia entre la 1^a y 2, se supone que es producto de la recombinación de los progenitores que han originado nuevos linajes. En el dendograma de distancias genéticas se observan claramente cuatro grupos diferentes correspondientes a los linajes EC1, EC2.1 y don nuevos, en donde uno de ellos tiene algo de similitud con el linaje EC-1, esto no significa que sean iguales sino que por su valor correspondiente a 0.97 muy cerca del uno es un linaje variante del EC-1. Según los estudios de Pozo (1997) quien encontró diferencias en el análisis de RFLP en poblaciones ecuatorianas para los linajes clonales de *Phytophthora* en tomate y papa, no se puede asegurar que estos linajes son específicos para cada hospedero, debido a que la progenie fue originada de un cruce sexual correspondiente entre aislados de diferentes hospederos (Anexo 4).

El análisis con RFLP no fue tan informativo debido a que la mayor cantidad de información se obtuvo con el análisis de microsatélites, por esta razón fueron escogidos uno o dos aislados correspondientes a cada familia que sean representativos para realizarlo.

En este trabajo se demostró que la reproducción sexual en el patógeno *Phytophthora infestans* es una fuente importante para generar variabilidad genética (Oliva, 2001) y de esta manera adaptarse al ambiente. La variabilidad genética se consigue gracias a la meiosis celular y el posterior intercambio y reordenamiento del material genético.

Tomando en cuenta que *Phytophthora infestans* es un organismo bisexual y heterotálico se puede esperar una alta proporción de progenie clonal. Sin embargo, se pudo identificar que la mayoría de individuos eran híbridos, lo que sugiere que no existe evidencia para pensar en barreras reproductivas entre poblaciones A1 y A2. Esta hipótesis contrasta con lo expuesto por Ordóñez *et al.*, (2000) quien rechaza un posible flujo génico entre estas poblaciones, esto se demuestra con el análisis de componentes principales, por la disposición de los individuos en el espacio. En la figura 4.2. 6 se observa a los padres A1 ubicados en la parte inferior izquierda y los padres A2 en la parte superior derecha, los hijos o progenie se encuentran dispersos por todo el plano lo que supone la existencia de híbridos.

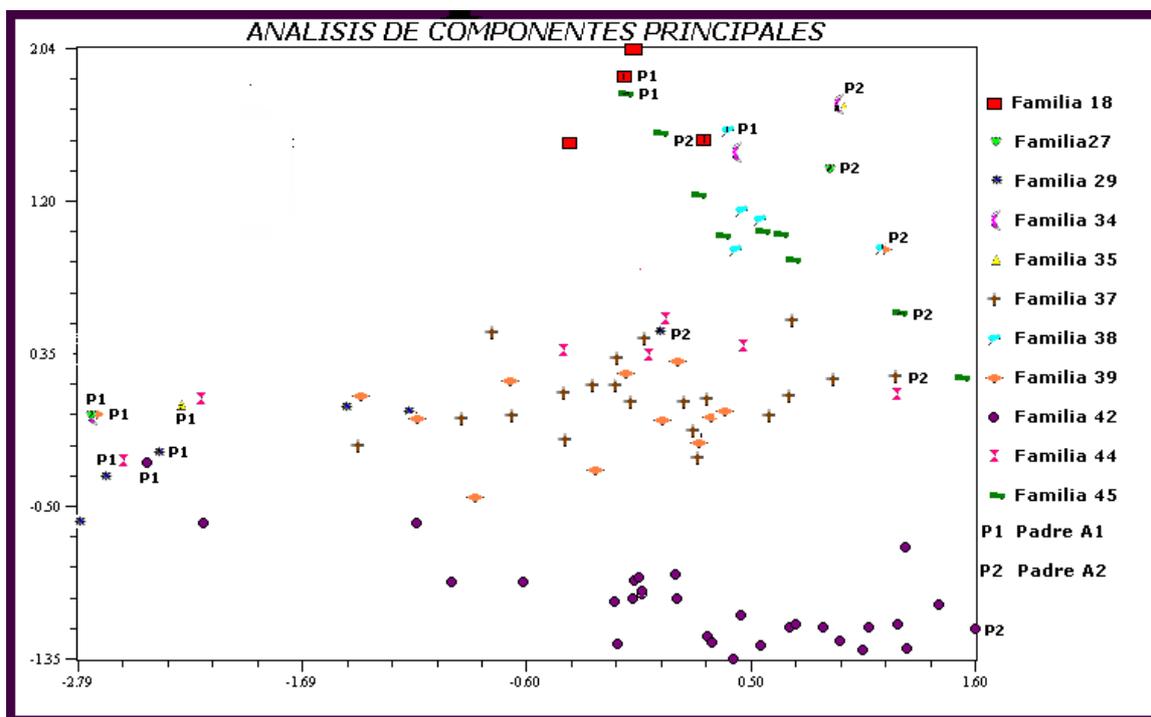


Figura 4.2. 6 Análisis de componentes principales realizado con todas las familias, cada figura corresponde a una familia específica, P1 corresponde al padre A1 y P2 al padre A2.

Utilizando un limitado número de marcadores se logró detectar alta cantidad de genotipos únicos después de un evento reproducción sexual, lo que presupone que si las condiciones son apropiadas, el patógeno puede generar muchos genotipos distintos de forma sexual. Estos genotipos serán seleccionados por su capacidad de colonizar un hospedero. En una segunda fase, el genotipo más apto se clonará masivamente de forma asexual, sin embargo según Oliva, 2001 pone en duda la viabilidad de las oosporas producidas por recombinación sexual suponiendo que la capacidad de producción de oosporas no asegura una germinación, es decir que puede haber un factor genético que influya en la viabilidad de las mismas (Judelson, 1997).

La mayoría de marcadores no segregó de forma mendeliana para un organismo diploide. A pesar de esto, algunos marcadores se alejaron estadísticamente de una segregación al azar. Esto puede deberse a un desbalance en los genotipos que germinaron o que algunos marcadores están asociados con alelos recesivos deletéreos. Tomando en cuenta que el ciclo sexual de *Phytophthora infestans* es poco probable Judelson (1997) la acumulación de loci defectuosos en los genomas provoca una incompatibilidad entre los aislados, especialmente en el momento en que se produce intercambio cromosómico, provocando la expresión de estos alelos defectuosos, generando la pérdida de homología en el genoma.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se llegó a estandarizar el método de microsatélites y se obtuvo un protocolo para el análisis del mismo.

El estudio de *Phytophthora infestans* es de suma importancia para la determinación del comportamiento del mismo, y a la vez para su respectivo control.

La alta variabilidad genética de la progenie sugiere que la reproducción sexual es un mecanismo importante, el cual es utilizado por el patógeno para adaptarse al ambiente.

La reproducción sexual puede ocasionar genotipos más agresivos que se adapten con facilidad a varios nichos ecológicos.

Al estudiar cada locus de forma independiente, se demostró que la gran mayoría de individuos obtenidos en la progenie se produjeron de forma sexual, debido a la diversidad existente en la misma.

No se puede decir que la población obtenida es idéntica a sus progenitores, por el análisis de distancias que localiza a cada padre de manera independiente.

Existe también la presencia de familias en la que casi todos sus hijos se parecen a uno de los padres (A2), pero esto se da en un porcentaje muy bajo en comparación con toda la progenie.

El análisis de Pep indica que la mayoría de la progenie, tiene tendencia a 76/100. La prueba de Gpi no nos da amplitud en los análisis debido a que no se puede observar la presencia de híbridos con los resultados, al contrario con el análisis de SSR podemos ver una alta diversidad de cada uno de los locus, brindando genotipos diferentes en cada una de las familias.

Los análisis estadísticos de algunos marcadores demuestran que la población no se rige a una proporción mendeliana en el caso de familias con mayor número de hijos, al contrario sucede con familias que poseen una cantidad de hijos menor.

Cada marcador molecular cumple un papel importante en la caracterización de la progenie, se determinó que el análisis de microsatélites brinda mayor cantidad de información en comparación del análisis de RFLP.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios de adaptabilidad a nuevos hospederos.

Se debería tomar como referencia la técnica de microsatélites para la determinación de nuevos genotipos y estudiar la relación existente entre estos y las características fenotípicas de los aislados.

Se podría repetir los estudios realizados con otros aislamientos no solo del Ecuador sino de países cercanos que tengan la presencia del tipo de apareamiento A2, para así formar una base de datos de polimorfismos del patógeno y en un futuro realizar monitoreos de las regiones que han sido estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, N., Erselius, L., Chacón, M., Flier, W., Ordoñez, M., Kroon, L., y Forbes, G. 2004. Genetic Diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato

in Ecuador Provides New Insight Into de Origin of This Important Plant Pathogen. *Phytopathol.* 94: 154-162.

- Anderson, J., y Kohn, L. 1995. Clonality in solborne, plant-pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytoopathol.* 33:369-391.
- Andrade, H., Cuesta, X., Oyarzun, P. (en linea) 1998.. Mejoramiento participativo en Ecuador aplicado al incremento de la severidad de *Phytophthora infestans* en el INIAP <http://www.prgaprogram.org/cds/fmp/NADINE-PDF/ANDRADE.pdf>>.
- Brasier, C., y Hansen, E.. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. I: genetic system, sexuality and the generation of variation. *Annual Review of Phytopathol.* 30:153-171.
- Brasier, C., Cooke, D., Duncan, J. 1999. Origin of new *Phytophthora* pathogen trough interspecific hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5878-5883.
- Carter, D., Archer, S. y Buck, K. 1990. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans* . *Mycol. Res.* 94:1123-1128.

- Chang, T, Ko. 1991. Factors affecting germination of oospores of *Phytophthora infestans*. Journal of Phytopathol. 133:29-35.
- Creste, S., Tulmann, N., y Figueira, A. 2001. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining Plant Molecular Biology Reporte 19:299-306.
- Claros Díaz, M. Marcadores moleculares: Qué son?, cómo se obtienen? y para qué valen? (en línea) 2002. Universidad de Málaga www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html.
- Drenth, A. 1994. Molecular genetic evidence for a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in Europe.
- Dobrowolski, M., Tommerup, I., Shearer, B., y O'Brien, P. Three Clonal Lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia Revealed by Microsatellites (en línea) 2002. <www.apsnet.org/phyto/pdfs/2003/0408-01R.pdf>.
- Echemendia, Y., 2002. Phytophthora: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.

- Erselius, L., Hohl, H., Ordoñez, M., Jarrín, F., Velasco, A., Ramon, M. y Forbes, G. 1999. Genetic diversity among isolates of *Phytophthora infestans* from various hosts in Ecuador. Program Report. International Potato Center. Pages 39-48.
- Erwin, D. y Ribeiro O. 1996a. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (1876). *Phytophthora Diseases Worldwide*. D. C. Erwin and O. K. Ribeiro. St. Paul, Minnesota, APS Press: 346-353.
- Erwin, D., y Ribero, K. 1996b. *Phytophthora Diseases Worldwide*. Minnesota (USA), APS press, pp346-353.
- Forbes, G., 1997a. Manual for Laboratory Work on *Phytophthora infestans*, Centro Internacional de la Papa. CIP Training manual. Quito, Ecuador.
- Forbes, G., Escobar, X., Ayala, C., Revelo, J., Ordoñez, M., Fry, B., Doucett, K., and Fry, W. 1997b. Population Genetic Structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology*. 87:375-380.
- Forbes, G., Goodwin, S., Denth, A., Oyarzun, P., Ordoñez, M. y Fry, W. . 1998. A Global Marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 82:811-818.

- Fry, W., Drenth, A., Spielman, L., Mantel, B., Davidse, L., y Goodwin, S. 1991. Population genetics structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Phytopathol.* 81: 1330-1336.
- Fry, W., Goodwin S., Matuszak J., Spielman, L., Milgroom, M. y Drenth, A. 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annual Review of Phytopathology* 30:107-129.
- Fry, W., Goodwin, S., Dyer, A., Matuszak, J., Drenth, A., Tooley, P., Sujkowski, L. Koh, Y., Cohen, B., Spielman, L., Deahl, K., Inglis, D., y Sandlan, K. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77: 653-661.
- Gavino, P., Smart, C., Sndrock, W., Miller, J., Hamm, P., Lee, T., Davis, R., Fry, W. 2000. Implications of sexual recombination for *Phytophthora infestans* in United States: generation of an aggressive lineage. *Plant Dis.* 84:731-735.
- Goodwin, S., Sujkowski, I., Dyer, A., Fry, B., y Fry, W. 1995a. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North Arnerica. *Phytopathology* 85:473-479.

- Goodwin, S., Sujkowski, L., y Fry, W. 1995b. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology* 85:669-676.
- Goodwin, S., Ludwik, S., Sujkowski., S y Fry, W. 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxil in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathol.* 86:793-800.
- Goodwin, S. 1997, The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathol.* 81: 462-473.
- Griffith, G., y Shaw, D. 1998. Polymorfism in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected following PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions.. *Microbiol.* 64:4007 – 4014.
- Griffiths, A. y Col. (en linea) 2000. An introduction to Genetic Analysis. Freeman. New York [http://www.intech.gov.ar/IIB-INTECH/html/docencia/BioVegetal/marcadores%20moleculares%20\(un\).pdf](http://www.intech.gov.ar/IIB-INTECH/html/docencia/BioVegetal/marcadores%20moleculares%20(un).pdf).
- Hartl D., Clarck A. 1994. Principles of Populations Genetics. 2Ed. Sinauer Associates.

- Informe Anual Cip. (en línea) 1998. Fotos sobre patología, Redepapa <http://www.redepapa.org/oosporas1.html>.
- Jaramillo, S. (en línea) 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín. <http://reuna.unalmed.edu.co/temporales/memorias/Monografia.pdf>.
- Judelson, H. 1997. The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge, Fungal Genet. And Biol. 22:65-76.
- Khaki, I. 1971. Genetical evidence for diploidy in *Phytophthora*. *Genet. Res.* 17:165- 167.
- Knapova, G., Tenzer, I., Gessler, C. y Gisi, U. 2001. characterisation of *Phytophthora infestans* from potato and tomato with molecular markers Biodiversity in Plant Pathology, Proceedings of the 5 th Congress of the European Foundation for Plant Pathology.
- Kimball, J. (en línea) 2005. Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). < <http://www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224/loose.dtd>>

- Maldonado, L., Delgado, M., y Garcia, C. Estudio de la Estructura Genetica de las Poblaciones de *Phytophthora Infestans* En Las Regiones Productoras de Papa En Colombia (en línea) 1999. <http://66.102.7.104/search?q=cache:dEMtFC4atgQJ:www.redepapa.org/infestans3.pdf++phytophthora+%2B+ciclo&hl=es -->>.
- Niederhauser, J. 1961. Genetic studies of *Phytophthora infestans* and *Solanum* species in relation to late-blight resistance in potato. *Phytopathol.* 1:491-497.
- Oliva, R. 2001 Compatibilidad sexual entre aislados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary y caracterización de la progenie F1. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito – Ecuador.
- Oliva, R., Erselius, L., Adler, N., Forbes, G. 2002. Potencial of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador, *Plant pathol.* 51:710-719.
- Ordóñez, M., Hohl, H., Velasco, J., Ramon, M., Oyarzum, P., Smart, C., Fry, W., Forbes, G. y Erselius, L. 2000. A Novel Population of *Phytophthora*, Similar to *Phytophthora infestans* Attacks Wild *Solanun* Species in Ecuador. *Phytopathol.* 90: 197-202.

- Ospina-Giraldo, M. y Jones, R. 2003. Characterization of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Phytophthora infestans* reveals the presence of multiple alleles. *Fungal Genetics and Biology* 40:197-206.
- Oyarzun, P., Taípe, J., y Forbes, G. (en línea) 2001. *Phytophthora infestans* activity and particularities in Ecuador.
<http://gilb.cip.cgiar.org/downloads/Others/Taller2001/1.3%20P.i.%20su%20actividad%20y%20particularidades%20en%20el%20Ecuador%20perfil%20de%20paisOK.pdf>.
- Perez, M. 1998. Sequential bulked typing: a rapid approach for detecting QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 96, 551—557.
- Pozo, A. 1997. Comparación entre poblaciones de *Phytophthora infestans* en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y papa (*Solanum tuberosum*) en Ecuador. Tesis de Ingeniería Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito – Ecuador.
- Reis, A., Smart, C., Fry, W., Maffia, L. y Mizubuti, E. Characterization of Isolates of *Phytophthora infestans* from Southern and Southeastern Brazil from 1998 to 2000 (en línea) 2000 < <http://www.apsnet.org/pd/pdfs/2003/0522-03R.pdf> >.

- Ritter, E., Lucca, F., Sanchez, I., Ruiz, J., Aragonés, A., Castanon, S., Bryan, G., Waugh, R., Lefebvre, V., Rouselle-Burgoise, F., Gebhardt, C., Eck, H., Os, H., Taco, J., y Bakker, J., 2004. Recursos Genómicos en la Papa y Posibilidades de su Explotación, Suplemento Revista Latinoamericana de la papa España.
- Robertson, N. 1991. The Challenge of *Phytophthora infestans*. Advance of Plant Pathology, Vol 7: *Phytophthora infestans* : The cause of Light Blight of Potato. (D.S. Ingram. P.H. Williams, eds). Academia Press, San Diego, USA.
- Rodríguez, D. 1996. Candelilla tardía de la papa y el tomate: un viejo problema de continua vigencia, FONAIAP Estación Experimental Trujillo, Pampanito, Trujillo.
- Roca y Ramirez, (en línea) 1999. Las Musáceas, Microsatélites <http://www.monografias.com/trabajos19/musaceas/musaceas.shtml>.
- Romagna, E. (en línea) 2006. Peronospora della patata e del pomodoro (*Phytophthora infestans*) Servizio Fitosanitario http://www.ermesagricoltura.it/wcm/ermesagricoltura/fitosanitario/avversita/peronospora_patata_pomodoro.htm.

- Sansome, E. y C. Basier. 1973. Diploidy and chromosomal structural hybridity in *P infestans*. *Nat.* 241:344-345.
- Samaucha, Y., y Gisi, U. 1987. Use of two- and three-way mixtures to prevent development of resistance to phenylamide fungicides in *Phytophthora* and *Plasmopora*. *Phytopathol* 77:1405-1409.
- Shaw, D. 1983. The Peronosporales-a fungal geneticist's nightmare. *In* Zoosporic Plant Pathogens: A Modern Perspective. S. T. Buczacki ,USA. p. 85-121.
- Spielman, L., Drenth, A., Davidse, L., Sujkowski, L., Gu, W., Tooley, P., Fry, W. 1991. A Second World-Wide Migration and Population Displacement of *Phytophthora infestans*?. *Plant Pathol.* 84:201-207.
- Tanksley, S., Young, N., Paterson, A., y Bonierbale, M. 1989. RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for and old science. *Biotechnol.* 7: 257-263.
- Therrien, C., Tooley, P., Spielman, L., Fry, W. , Rith, D.. y Shelly, S. 1993. Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. *Mycol. Res.* 97:945-950.

- Tooley, P. y Villarreal, M. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans*. Journal of Heredity 76:431-435.
- Vera, G., Shattock, R., Bustamante, E. (en línea) 2000. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* nativos en Costa Rica <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip55/art6-a.htm#Introducción>.
- William E. Fry W. (en línea) 1997. Plant Epidemiology, The American phytopathological society . (<http://www.apsnet.org/online/lateblite/papers/lb001.htm>).
- Wei, H., Jun, W., Chujoy, E., Yanli, Y., Yi, W., Zhiming, Z., Kiyun X. (en línea) 1998. Potato Late Blight (*Phytophthora infestans*) situation in Asia with Special Reference to China <http://gilb.cip.cgiar.org/downloads/Gilb99/08wei.pdf>.
- Zhang, Z., Zhu, J., Song, B., Li, Y., Tian, S., y Jiang, H., 2001. Further investigation on A2 mating type of *Phytophthora infestans* in China. Journal of Agricultural University of Hebei.
- Zentmyer, G. 1985. The world of *Phytophthora*. Páginas 1-7. En: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. Eds. D. C. Ewin, S. BartnickGarcia, P. H. Tsao. U.S.A.

TABLAS

Tabla 4.1.1. 1: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 18 y 27, para el análisis de la isoenzima peptidasa.

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
18		(4)	(4)
76/76	1/4	1	0
76/100	1/2	2	4
100/100	1/4	1	0
		G =	4

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
27		(2)	(2)
96/100	1/4	0,5	1
76/96	1/4	0,5	0
76/100	1/4	0,5	1
100/100	1/4	0,5	0
		G =	2

Tabla 4.1.1. 2: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 29 y 34, para el análisis de la isoenzima peptidasa.

GENOTIPO FAMILIA	HIPOTESIS PLANTEADA	NUMERO ESPERADO	NUMERO OBSERVADO
29		(7)	(7)
96/100	1/4	1,75	2
76/96	1/4	1,75	0
76/100	1/4	1,75	2
100/100	1/4	1,75	3
		G =	2,7143

GENOTIPO FAMILIA	HIPOTESIS PLANTEADA	NUMERO ESPERADO	NUMERO OBSERVADO
34		(3)	(3)
96/100	1/4	0,75	0
76/96	1/4	0,75	0
76/100	1/4	0,75	3
100/100	1/4	0,75	0
		G =	9

Tabla 4.1.1. 3: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 35 y 37, para el análisis de la isoenzima peptidasa.

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
35		(4)	(4)
96/100	1/4	1	1
76/96	1/4	1	0
76/100	1/4	1	3
100/100	1/4	1	0
		G =	6

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
37		(22)	(22)
96/100	1/4	5,5	1
76/76	1/4	5,5	0
76/100	1/4	5,5	19
100/100	1/4	5,5	2
		G =	44,5454

Tabla 4.1.1. 4: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 38 y 39, para el análisis de la isoenzima peptidasa.

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
38		(6)	(6)
76/76	1/4	1,5	0
76/100	1/4	3	6
100/100	1/4	1,5	0
		G =	6

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
39		(12)	(12)
96/100	1/4	3	1
76/96	1/4	3	0
76/100	1/4	3	11
100/100	1/4	3	0
		G =	28,6667

Tabla 4.1.1. 5: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 42 y 44, para el análisis de la isoenzima peptidasa.

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
----------	-----------	--------	--------

FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
42		(41)	(41)
96/100	1/4	10,25	3
76/76	1/4	10,25	0
76/100	1/4	10,25	38
100/100	1/4	10,25	0
		G =	100,7561

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
44		(2)	(2)
76/76	1/4	2	0
76/100	1/2	4	8
100/100	1/4	2	0
		G =	8

Tabla 4.1.1. 6: Segregación de genotipos en la progenie de la familia 45,
para el análisis de la isoenzima peptidasa.

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
----------	-----------	--------	--------

FAMILIA	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
45		(8)	(8)
96/100	1/4	2	1
76/96	1/4	2	0
76/100	1/4	2	7
100/100	1/4	2	0
		G =	17

Tabla 4.1.2. 1: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 18 y 27, para el análisis de la isoenzima Glucosa - 6 – Fosfato Isomerasa.

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
FAMILIA 18	PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO

		(4)	(4)
86/100	1/2	2	4
100/100	1/2	2	0
		G =	4

		NUMERO	NUMERO
GENOTIPO	HIPOTESIS	ESPERADO	OBSERVADO
FAMILIA 27	PLANTEADA	(2)	(2)
90/100	1/2	1	2
100/100	1/2	1	0
		G =	2

Tabla 4.1.2. 2: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 29 y 34, para el análisis de la isoenzima Glucosa - 6 – Fosfato Isomerasa.

		NUMERO	NUMERO
GENOTIPO	HIPOTESIS	ESPERADO	OBSERVADO
FAMILIA 29	PLANTEADA	(7)	(7)
86/90	1/4	1,75	0
90/100	1/4	1,75	5

86/100	1/4	1,75	2
100/100	1/4	1,75	0
		G =	9,5714

		NUMERO	NUMERO
GENOTIPO	HIPOTESIS	ESPERADO	OBSERVADO
FAMILIA 34 PLANTEADA		(3)	(3)
90/100	1/2	1,5	2
100/100	1/2	1,5	1
		G =	0,3333

Tabla 4.1.2. 3: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 35 y 37, para el análisis de la isoenzima Glucosa - 6 – Fosfato Isomerasa.

		NUMERO	NUMERO
GENOTIPO	HIPOTESIS	ESPERADO	OBSERVADO
FAMILIA 35 PLANTEADA		(4)	(4)
90/100	1/2	2	3
100/100	1/2	2	1
		G =	1

		NUMERO	NUMERO
GENOTIPO	HIPOTESIS	ESPERADO	OBSERVADO
FAMILIA 37	PLANTEADA	(22)	(22)
90/100	1/2	11	5
100/100	1/2	11	17
		G =	6,5454

Tabla 4.1.2. 4: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 38 y 39, para el análisis de la isoenzima Glucosa - 6 – Fosfato Isomerasa.

		NUMERO	NUMERO
GENOTIPO	HIPOTESIS	ESPERADO	OBSERVADO
FAMILIA 38	PLANTEADA	(6)	(6)
100/100	1	6	6
		G =	0

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO ESPERADO	NUMERO OBSERVADO
FAMILIA 39	PLANTEADA	(12)	(12)
90/100	1/2	6	3
100/100	1/2	6	9
		G =	3

Tabla 4.1.2. 5: Segregación de genotipos en la progenie de las familias 42 y 44, para el análisis de la isoenzima Glucosa - 6 – Fosfato Isomerasa.

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO ESPERADO	NUMERO OBSERVADO
FAMILIA 42	PLANTEADA	(41)	(41)
90/100	1/2	20,5	8
100/100	1/2	20,5	33
		G =	15,2439

GENOTIPO	HIPOTESIS	NUMERO	NUMERO
----------	-----------	--------	--------

FAMILIA 44		PLANTEADA	ESPERADO	OBSERVADO
			(8)	(8)
100/100	1		8	8
			G =	0

Tabla 4.1.2. 6: Segregación de genotipos en la progenie de la familia 45, para el análisis de la isoenzima Glucosa - 6 – Fosfato Isomerasa.

		NUMERO	NUMERO
GENOTIPO	HIPOTESIS	ESPERADO	OBSERVADO
FAMILIA 45		(8)	(8)
90/100	1/2	4	3
100/100	1/2	4	5
		G =	0,5

FIGURAS

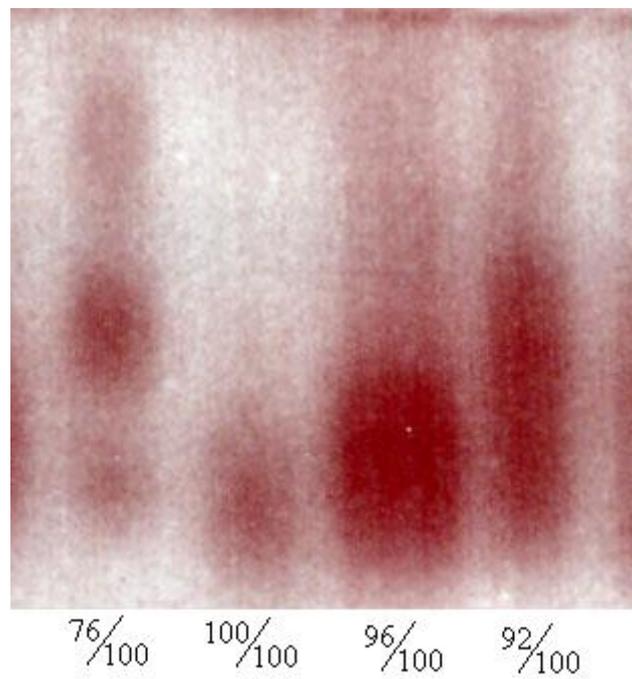


Figura 4.1 Análisis enzimáticos: Patrón de bandas obtenido por el análisis con la isoenzima Peptidasa, revelado en geles de poliacrilamida, (resolución y apilamiento).

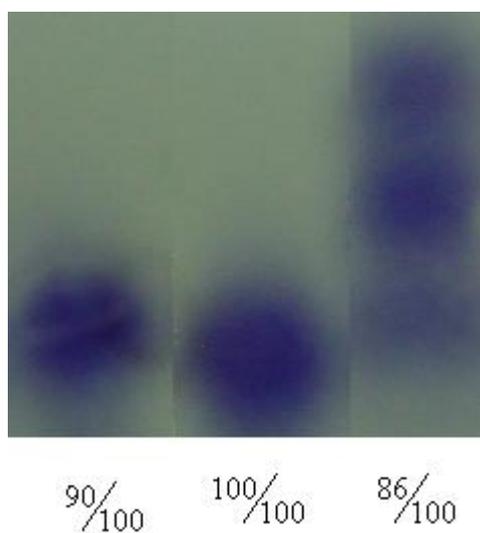


Figura 4.2 Análisis enzimáticos: Patrón de bandas obtenido por el análisis con la isoenzima Glucosa-6-Fosfato Isomerasa, revelado en geles de almidón.

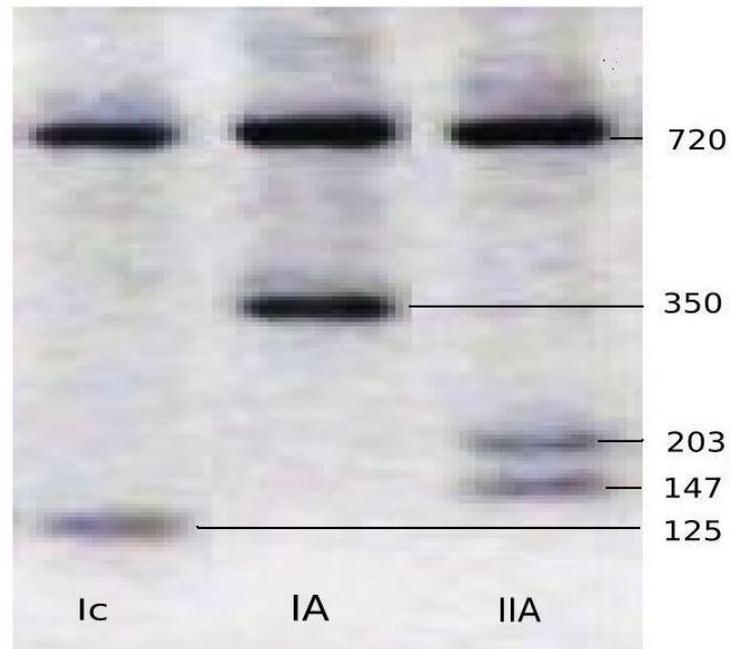


Figura 4.3. 1 Análisis de DNA Mitocondrial: Haplotipos mitocondriales de la región P2 visualizados en un gel de agarosa al 2%.

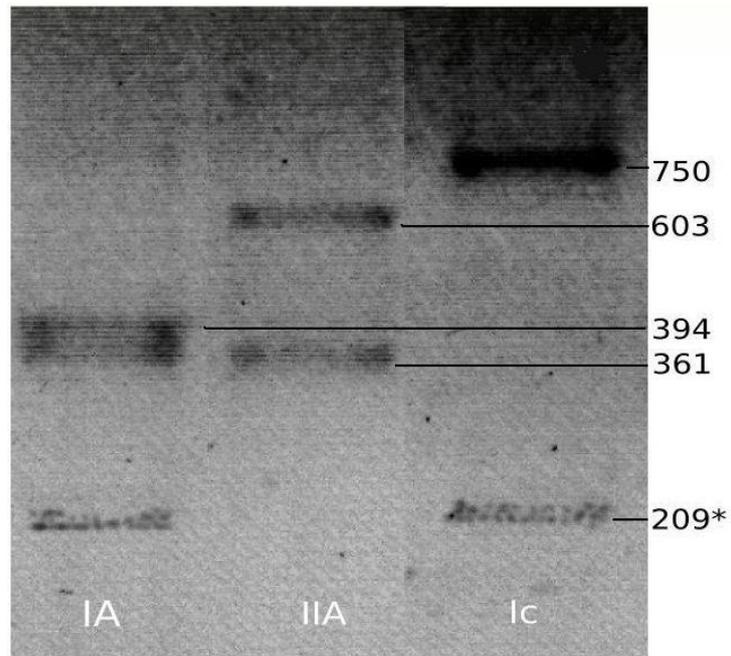


Figura 4.3. 2 Análisis de DNA Mitocondrial: Haplotipos mitocondriales de la región P4 visualizados en un gel de agarosa al 2% *Banda 209 retocada por falta de resolución.

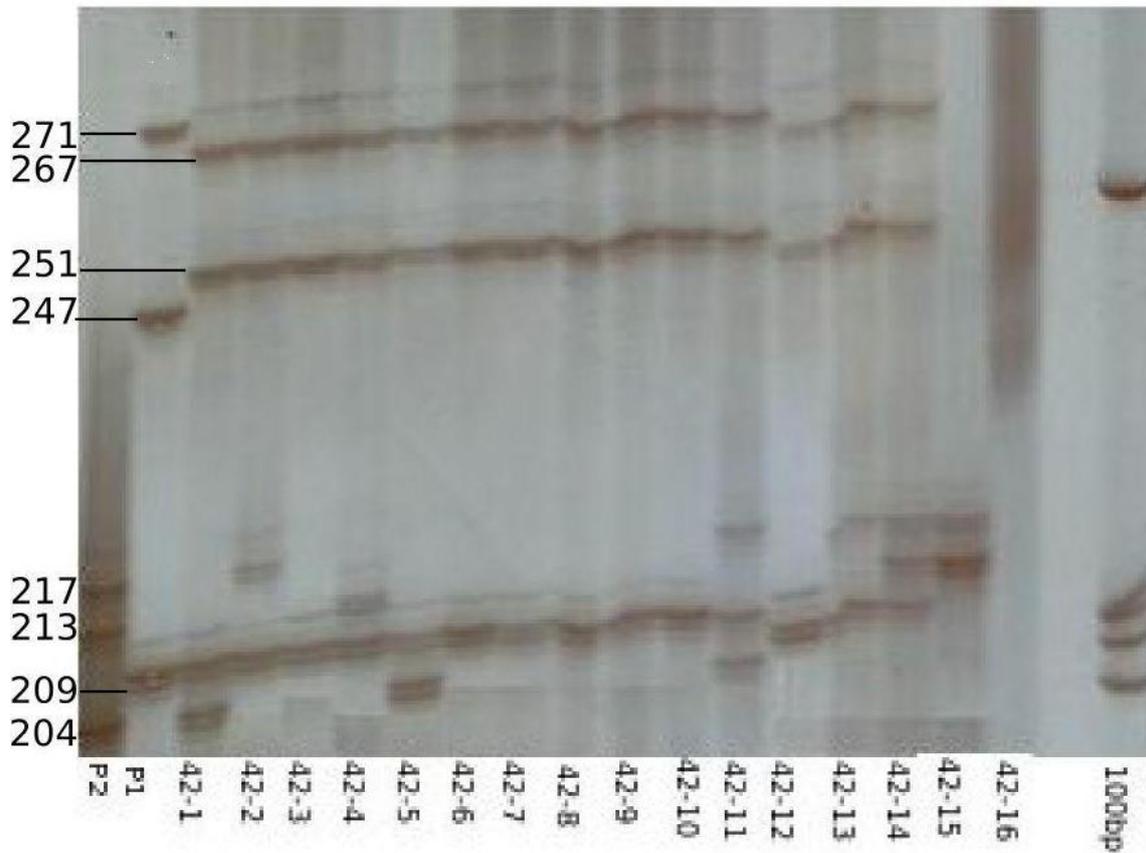


Figura 4.4. 1 Análisis de Microsatélites: Patrón de bandas obtenido de la amplificación del locus Pi4B y resuelto con nitrato de plata, P1 correspondiente al padre A1 y P2 correspondiente al padre A2 (Foto de una parte de l familia

42).

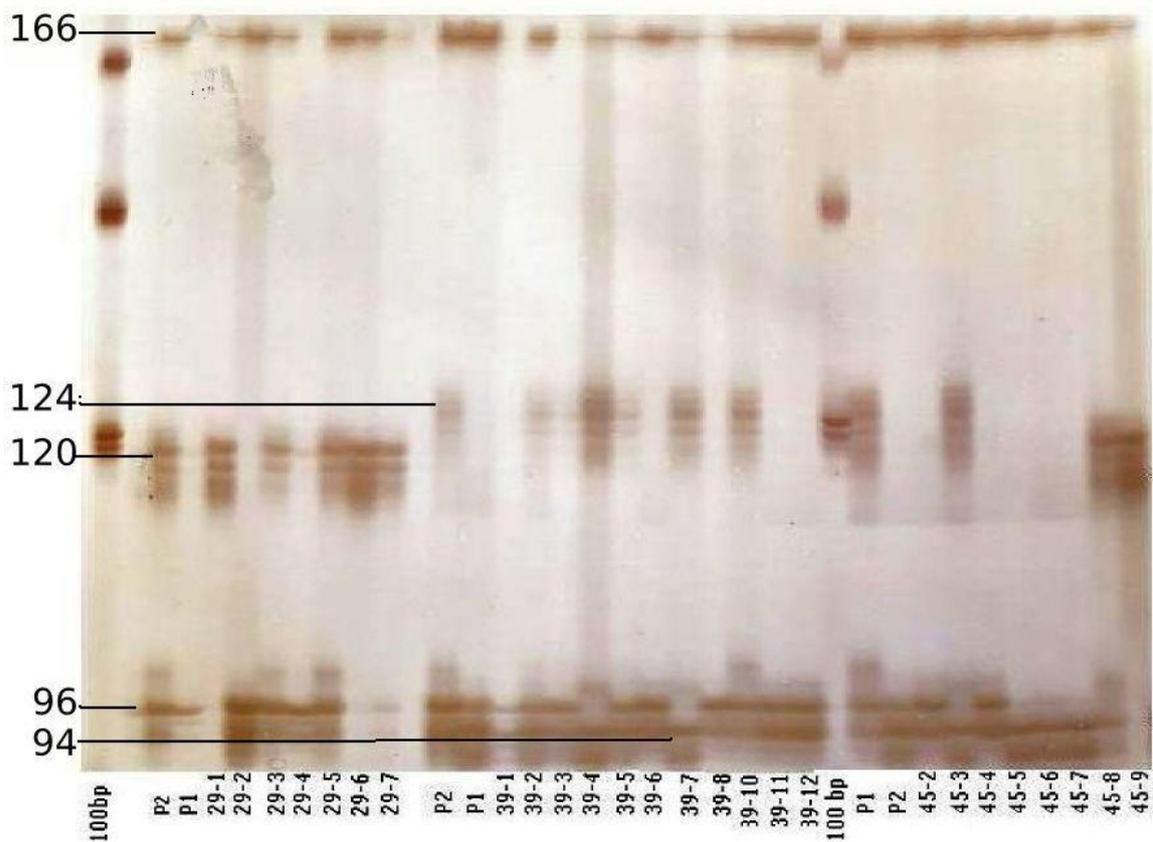


Figura 4.4. 2 Análisis de Microsatélites: Patrón de bandas obtenido de la amplificación del locus Pi1F y resuelto con nitrato de plata, P1 correspondiente al padre A1 y P2 correspondiente al padre A2 (Foto de las familias 29, 39 y 45).

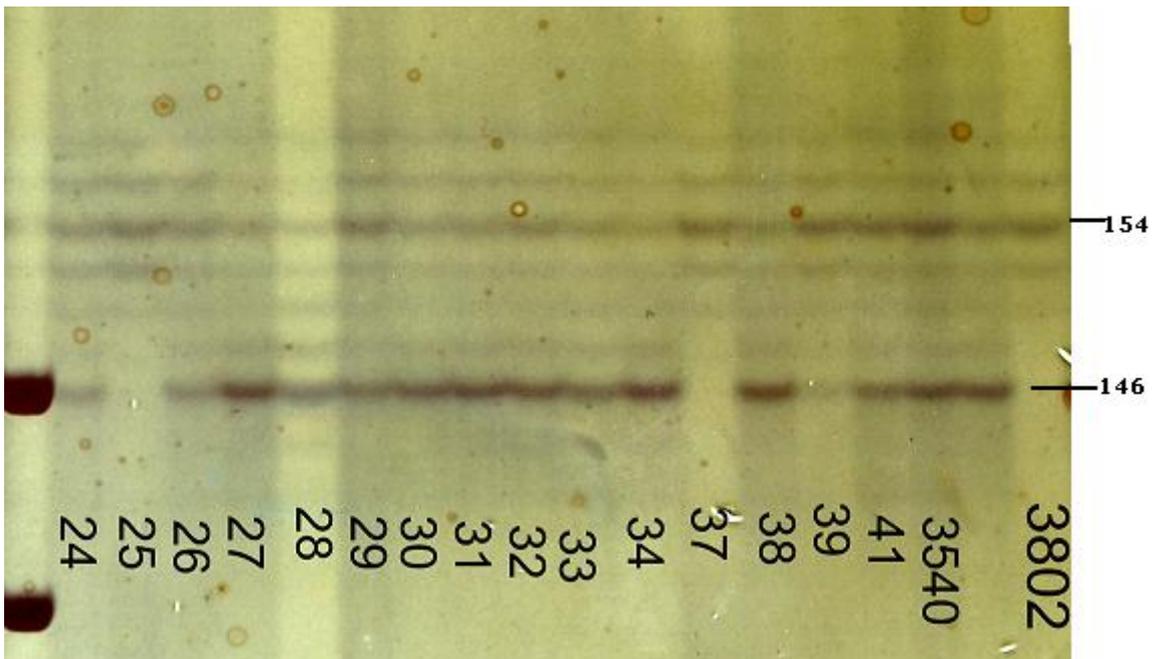


Figura 4.4. 3 Análisis de Microsatélites: Patrón de bandas obtenido por la amplificación del locus Pi2D y resuelto con nitrato de plata (Foto de una parte de la familia 42).

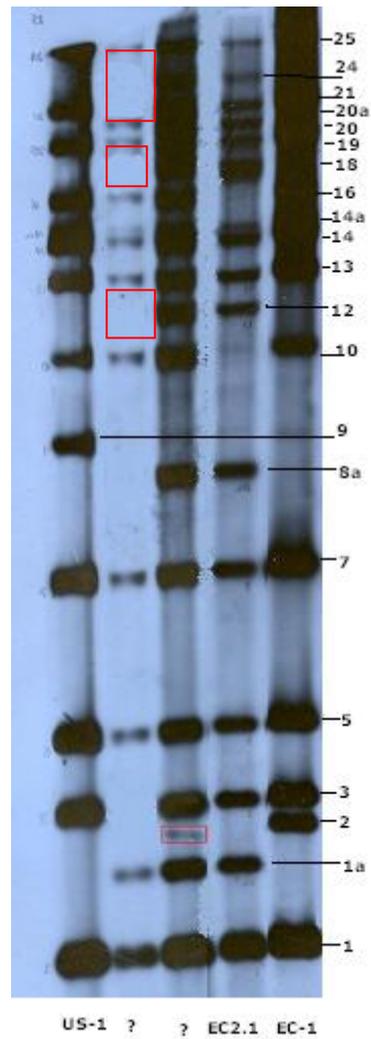


Figura 4.5 RFLP. Patrón de Bandas obtenido por el análisis de los polimorfismos de las secuencias de restricción, determinación de los diferentes linajes clonales, EC1 y EC2.1, dos nuevos linajes producto de la recombinación.

ANEXOS

ANEXO 1

MANUAL DE USUARIO PARA MICROSATELITES

LAVADO DE LOS VIDRIOS:

1. Lavar cada uno de los vidrios con solución de tergazime el cual es un detergente enzimático que elimina residuos (10gr/lit) durante 2 horas.
2. Enjuagar con agua destilada por 30 minutos.
3. Hacer 2 enjuagues cortos con agua destilada por 5 minutos.
4. Dejar escurrir hasta que los vidrios estén secos.

PREPARACION DE LOS VIDRIOS

1. Limpiar los vidrios con etanol al 100% utilizando algodón y realizando movimientos uniformes en un mismo sentido y dejar que este se evapore por completo (hacer esto tres veces), cambiando el algodón cada vez que se repita el procedimiento y el sentido (de derecha a izquierda y de arriba abajo).
2. Hacer lo mismo con isopropanol (2 veces).
3. Preparar la solución adherente (6 μ l ácido acético glacial + 6 μ l xileno + 2ml de etanol 100%).
4. Colocar la solución adherente (0.25 ml) sobre un papel facial y pasarlo sobre el vidrio grande (vidrio sin cortes), haciendo movimientos rápidos y uniformes de derecha a izquierda y en un mismo sentido, (dejar que esta solución se seque por 10 minutos).
5. Colocar la solución repelente (0.5 ml) sobre un papel facial y pasarlo sobre el vidrio pequeño (vidrio con corte), haciendo los mismos movimientos que en el paso anterior (dejar secar la solución por 10 minutos).

6. Una vez terminado el proceso anterior se deben limpiar los excesos de solución en cada uno de los vidrios. El vidrio que tiene la solución repelente se debe limpiar frotando un papel facial sobre el vidrio en una sola dirección y luego en la dirección contraria (dos veces cada sentido) se debe hacer un poco de presión sobre el mismo.
7. Para el vidrio que contiene la solución adherente se colocan aproximadamente 2 ml de etanol 95% sobre un papel facial y se frota el vidrio con movimientos uniformes en un sentido, se deja que este se evapore por completo y luego se repite el procedimiento con un papel nuevo, en sentido contrario (2 veces).
8. Después de 5 minutos unir los vidrios colocando los separadores. Sellar la parte inferior de los vidrios con masquin, para evitar que la solución de poliacrilamida se riegue.

PREPARACION DEL GEL

SOLUCIÓN DE POLIACRILAMIDA 20:1

Reactivo	Cantidad	
	1ml	400 ml
UREA (7.5M):	0.4504 gr	180.16 gr
Acrilamida:	0.0570 gr	22.8 gr
Bisacrilamida:	0.0030 gr	1.2 gr
TBE 10X:	0.1000 ml	40 ml

Para preparar la poliacrilamida se debe diluir primero la urea en agua caliente, con un volumen menor al que se va a utilizar, (debido a que la cantidad que se coloca de esta hace que aumente el volumen) a continuación se debe colocar el TBE 10X, la acrilamida y bisacrilamida.

Recomendaciones:

Hay que tener mucho cuidado el momento de pesar la acrilamida y bisacrilamida debido a que es neurotoxica y se absorbe a través de la piel. La solución es toxica cuando se encuentra en estado liquido, aunque cuando esta polimerizada hay que tener cuidado por si hay restos que no lo estén, para esto se necesita trabajar a parte de los guantes con gafas y mascarillas.

CARGAR EL GEL

1. Tomar 90 ml de solución preparada de poliacrilamida y colocar el temed y APS.

Solución	Cantidad
Temed	49.5 μ l
APS	495 μ l

Estas cantidades varían en dependencia del volumen de solución de poliacrilamida.

2. Antes de cargar el gel se mide el espacio en el frente de corrida metiendo el peine con los dientes para adentro, dejando un espacio para

que se pueda inyectar la muestra y se traza una línea guía que nos servirá cuando vayamos a inyectar el gel, se debe sacar los peines y.

3. Cargar el gel con la solución de poliacrilamida preparada anteriormente inclinando los vidrios a unos 50 grados en referencia a la mesa evitando que se formen burbujas, y luego colocar el peine hasta la línea guía con el lado de los dientes hacia fuera, (el lado contrario a los dientes para adentro de los vidrios) hay que tener cuidado de no colocar el peine al revés porque no se obtendrán buenos resultados.
4. Dejar que la acrilamida polimerice por dos horas, ubicando los vidrios de forma horizontal.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

1. Extracción de DNA (Capitulo 3.1).
2. Preparación del master mix utilizando los primer designados (4B y 2D) empleando las siguientes cantidades.

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua		1.50 ul
Buffer 10X	10 X	1 ul
MgCl ₂	3.50 mM	1.40 ul
dNTP's	10 mM	0.40 ul
Primers	20 mM	0.20 ul

Taq		
Polimerasa	15 U	0.30 μ l
DNA	5 ng/ μ l	5 μ l

Para el Primer 1F las cantidades cambian de la siguiente manera:

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua		1.50 μ l
Buffer 10X	10 X	1 μ l
MgCl ₂	3.50 mM	1.40 μ l
dNTP's	10 mM	0.20 μ l
Primers	20 mM	0.10 μ l
Taq		
Polimerasa	15 U	0.20 μ l
DNA	5ng/ μ l	5 μ l

Las cantidades son para una muestra, el programa es el siguiente:

3. Amplificar las muestras utilizando el siguiente programa:

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	94	2 min. μ l

2	94	40 seg.
3	57	40 seg.
4	72	20 seg.
5	a 2*35v	
6	72	10 min.
7	4	∞

Hay que tomar en cuenta la temperatura de anillamiento para cada uno de los primers, en el caso de los primers 2D y 4B la temperatura es 57°C, y en caso del primer 1F es 59°C. El programa se encuentra registrado como μ sat en el termociclador designando la temperatura de anillamiento a la que se quiere utilizar (ejm. μ sat57).

- Una vez amplificadas las muestras se verifica en un gel de agarosa al 1%, en donde se observan bandas entre 100 y 300 pb en dependencia de los primers que se utilizaron.

CARGAR LAS MUESTRAS EN EL GEL

- Denaturar (98 grados por 5 minutos) las muestras previamente amplificadas con 2 μ l de colorante y colocarlas inmediatamente en hielo, o en el congelador.
- Eliminar el exceso de urea lavando los vidrios, retirando el masquin del filo.

3. Armar la cámara de electroforesis y precalentar el gel a 2000 V durante 15 min, o 1500V durante 45 min hasta que los vidrios lleguen entre 45-50 grados (utilizando buffer TBE 1X).
4. Una vez precalentado el gel, lavar los excesos de urea que quedan entre los vidrios antes de colocar el peine, (con los dientes hacia adentro) hasta que el filo de los mismos pase a través de la poliacrilamida.
5. Cargar el gel con las muestras lavando periódicamente cada posillo con la misma solución TBE1X.
6. Correr el gel en dependencia del primer 800V si es 4B y a 600V si son el resto, durante toda la noche.
7. Para finalizar la corrida hay que dejar que migren los dos colorantes El primero que sale es el azul por su peso (60bp) y el segundo, el celeste que tiene un peso de 106bp, El tiempo de corrida varia dependiendo del primer usado: Para el caso del primer 4B hay que esperar 40 minutos después que el colorante celeste salga con un voltaje de 1500V en el caso del primer 2D, se sale el celeste e inmediatamente se procede a abrir el gel, para el primer 1F el celeste tiene que llegar unos 7 cm. por sobre el filo del vidrio y se procede a abrir.
8. Para abrir el gel primero se retiran los espaciadores y el peine, a continuación con ayuda de una espátula de plástico se la introduce dando ligeros golpes en la parte central superior.

TINCION DE LAS MUESTRAS

Fijación: Fijar las muestras con una solución de ácido acético 10% durante 20 minutos.

Enjuagar el gel con tres lavados de 2 minutos con agua destilada.

Reducción de background: Colocar Ácido Nítrico 1% durante 1-2 minutos.

Enjuagar el gel con tres lavados de 2 minutos con agua destilada.

Tinción: Colocar el gel durante 40 minutos en la solución de nitrato de plata.

Enjuagar durante 10 segundos.

Revelado: Revelar el gel con una solución de Carbonato de calcio 30gr/lt, 5 minutos antes colocar 500ul de Tío sulfato de sodio (STS) y 1,5ml de formaldehído, dejar de 8 a 15 minutos hasta que las bandas sean visibles.

Lavar el gel con agua destilada por 5 minutos, y dejarlo secar; tomar datos.

Para retirar la acrilamida del vidrio, se utiliza una solución de hidróxido de sodio 2N.

ANEXO 2:

Cuadro resumen de los resultados obtenidos en la investigación, los valores se designan en el siguiente orden de izquierda a derecha: Tipo de apareamiento (MT), Análisis de Glucosa-6-fosfo isomerasa (Gpi), Análisis de peptidasa (Pep), Análisis de DNA mitocondrial (mtDNA), Polimorfismo de la Longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Análisis de microsatélites (Microsatélite), especificando los valores de los alelos para cada par de primers (4B, 2D, 1F). Los colores representan a cada familia, los padres también están pintados.

	CRUCE	MT	GPI	Pep	mtDNA	RFLP	Microsatélite		
							4B	1F	2D
PC 18	3828	A2	86/100	76/100	lc		213-247-263	94-124-165	146
	3823	A1	100/100	76/100	IA		209-247-263-289	94-124-166	146-157
	PC18-2	A1	86/100	76/100	IA		209-247-263-289	94-124-166	146
	PC18-3	A1	86/100	76/100	IA		213-247-263-267-289	94-124-166	146-157
	PC18-4	A1	86/100	76/100	IA		209-213-247-263-289	94-124-166	146
	PC18-5	A1	86/100	76/100	IA		209-247-263-289	94-124-166	146
PC27	3816	A2	100/100	76/100	lc		209-247-283	94-166	146-157
	3607	A1	90/100	96/100	IIA	EC1	204-213-217	120-166	157
	PC27-1	A1	90/100	76/100	IIA		204-213-217	120-166	146-157
	PC27-2	A1	90/100	96/100	IIA		204-213-217	120-166	157
PC 29	3785	A2	86/100	76/100	lc		213-247-263	120	146-157
	3531	A1	90/100	96/100	IIA	EC1	204-213-217	94-164	157
	PC29-1	A1	90/100	96/100	IIA	EC1	204-213-217	120-164	157
	PC29-2	A1	86/100	76/100	IIA		204-213-247-263	120-164	146-157
	PC29-3	A1	86/100	96/100	IIA		204-213-217	94-120-164	157
	PC29-4	A1	90/100	100/100	IIA		204-213-217	120-164	157
	PC29-5	A1	90/100	100/100	IIA	EC1	204-213-217	120-164	157
	PC29-6	A1	90/100	100/100	IIA		204-213-217	120-164	157
	PC29-7	A1	90/100	76/100	lc		204-213	120	146-157
PC 34	3615	A2	100/100	76/100	lc		209-247-289	94-166	146
	3807	A1	90/100	96/100	IIA		204-213-217	120-166	157
	PC34-1	A2	90/100	76/100	IIA		209-247-289	94-166	146
	PC34-2	A2	100/100	76/100	lc		209-247-289	94	146
	PC34-3	A2	90/100	76/100	lc		209-247-290	94-166	146
PC 35	3615	A2	100/100	76/100	lc		209-247-289	94-166	146
	3800	A1	90/100	96/100	IIA		204-213-217	120-166	157
	PC35-1	A1	100/100	96/100	lc		209-213-217	94-120-166	146-157
	PC35-2	A2	90/100	76/100	lc		209-247-289	94-166	146
	PC35-3	A2	90/100	76/100	lc		209-247-289	94-166	146
	PC35-4	A2	90/100	76/100	lc		209-247-289	94-166	146

PC 37	3541	A2	100/100	76/100	lc	EC2.1	209-247-267	94-164	146-157
	3807	A1	90/100	96/100	IIA	EC1	204-213-217	120	157
	PC37-1	A2	100/100	76/100	lc		204-209-247-267	94	157
	PC37-2	A2	100/100	76/100	lc		204-209	94-120-164	146-157
	PC37-3	A1	100/100	76/100	lc		209-217-247-267	94-120-164	146-157
	PC37-4	A1	100/100	96/100	lc		209-247-267	94-164	146-157
	PC37-5	A1	100/100	76/100	IIA		204-209-213-247-267	94-120-164	146-157
	PC37-6	A1	100/100	76/100	lc		209-217	94-164	146-157
	PC37-7	A2	90/100	76/100	lc		204-213-247-267	94-164	146-157
	PC37-8	A1	90/100	76/100	lc		204-209-213-247-267	94-120-164	146-157
	PC37-9	A1	90/100	76/100	lc		209-217-247-267	148-164	157
	PC37-10	A2	100/100	76/100	lc		209-213-247-267	94-120-164	146-157
	PC37-11	A1	100/100	76/100	lc		209-213-217-221*	94	157
	PC37-13	A1	100/100	100/100	lc		213-217	94	157
	PC37-14	A2	90/100	76/100	lc		209-213-247-267	120	146-157
	PC37-15	A1	100/100	76/100	lc		209-217-247-267	94-120-164	146-157
	PC37-16	A1	100/100	76/100	lc	EC1	204-209-213-247-267	120-164	146-157
	PC37-17	A2	90/100	76/100	lc		209-213-247-267	94-164	146-157
	PC37-18	A1	100/100	76/100	lc	EC2.1	204-209-213-247-267	94-164	146-157
	PC37-19	A1	100/100	76/100	lc		209-217-247-267	164	146-157
	PC37-20	A1	100/100	76/100	IIA	EC1	209-217-247-267	94-120-164	146-157
	PC37-21	A2	100/100	76/100	lc	EC2.1	204-209-217-247-267	94-120-164	146-157
	PC37-22	A2	100/100	76/100	lc		209-213-247-267	94-164	146-157
PC37-23	A1	100/100	100/100	lc		204-209-213-217	94-120-164	146-157	
PC 38	3540	A2	100/100	76/100	lc	EC2.1	209-247-271	96-166	146-157
	3818	A1	100/100	76/100	IA	EC1	209-247-267-283	94-124-166	146
	PC38-1	A1	100/100	76/100	lc	EC1	209-247-271	96-166	146-157
	PC38-2	A2	100/100	76/100	lc		209-247-267-271-283	96-166	146
	PC38-3	A1	100/100	76/100	lc		209-247-271	96-124	146-157
	PC38-4	A2	100/100	76/100	lc		209-247-271	96-166	146-157
	PC38-5	A2	100/100	76/100	lc		209-247-271	96-166	146-157
PC38-6	A1	100/100	76/100	lc		209-247-267-271-283	96-124-166	146-157	
PC 39	3540	A2	100/100	76/100	lc	EC2.1	209-247-271	96-120-164	146-157
	3807	A1	90/100	96/100	IIA		204-213-217	120	157
	PC39-1	A1	90/100	76/100	IIA		204-209-213	96-164	146-157
	PC39-2	A1	100/100	76/100	lc		204-209-247-271	96-120-164	146
	PC39-3	A1	100/100	76/100	lc		209-213-247-271	96-164	146-157
	PC39-4	A2	100/100	76/100	IIA		209-213-217-247-271	96-120-164	146-157
	PC39-5	A2	100/100	76/100	lc		204-213-217	96-164	157
	PC39-6	A1	100/100	76/100	lc		217-247-271	120-164	146-157
	PC39-7	A2	90/100	76/100	lc		204-209-247-271	120-164	146-158
	PC39-8	A2	100/100	96/100	lc		209-217-247-271	120-164	146-157
	PC39-10	A1	90/100	76/100	IIA		213-217-247-263-271	120-164	146-157
	PC39-11	A2	100/100	76/100	lc		204-209-213-247-271	96-120-164	146-157
	PC39-12	A2	100/100	76/100	lc		204-209-213-247-271	120-164	146-157
	PC39-14	A1	100/100	76/100	lc		213-217-247-271	96-120-164	146-157

PC 42	3260	A2	100/100	76/100	lc	EC2	209-251-267	96-164	146-157
	3802	A1	90/100	96/100	IIA	EC1	204-209-213-217	120	157
	PC42-1	A2	100/100	76/100	lc		209-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-2	A2	100/100	76/100	lc		209-251-267	120-164	146-157
	PC42-3	A2	100/100	76/100	lc		209-251-267*	164	146-157
	PC42-4	A2	100/100	76/100	lc		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-5	A2	100/100	76/100	lc		209-251-267*	164	146-157
	PC42-6	A2	100/100	76/100	lc		209-217-251-267	120-164	146-157
	PC42-7	A2	100/100	76/100	lc		207-213-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-8	A2	100/100	76/100	lc		209-213-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-9	A1	100/100	76/100	lc		209-217-251-267*	120-164	146-157
	PC42-10	A2	100/100	76/100	lc		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-11	A2	100/100	76/100	lc		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-12	A2	100/100	76/100	lc		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-13	A2	100/100	76/100	lc		213-251-267	120-164	146-157
	PC42-14	A2	100/100	96/100	lc	EC1	209-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-15	A1	100/100	76/100	lc		204-209-251-267	120-164	146-157
	PC42-16	A2	90/100	76/100	lc		213-217-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-17	A1	90/100	76/100	IIA		204-209-213	96-120-164	146-157
	PC42-18	A2	100/100	76/100	IIA	EC2.1	204-209-217-251-267	120-164	146-157
	PC42-19	A2	90/100	76/100	IIA		209-251-267*	164	146-157
	PC42-20	A1	100/100	96/100	lc		204-213-217-251-267	120-164	146-157
	PC42-21	A1	90/100	76/100	lc		204-213-217-251-268	120-165	146-158
	PC42-22	A2	100/100	76/100	lc		204-209-217-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-23	A2	100/100	76/100	IIA		209-213-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-24	A1	90/100	96/100	IIA		213-217	96-120-164	157
	PC42-25	A1	100/100	76/100	lc		209-213-217-251-267	96-164	146-157
	PC42-26	A1	100/100	76/100	lc		209-217-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-27	A2	100/100	76/100	lc		209-213-251-267	96	146-157
	PC42-28	A1	100/100	76/100	lc		204-209-217-251-267	96-120-164	146-157
	PC42-29	A2	100/100	76/100	IIA		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-30	A2	100/100	76/100	IIA		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-31	A2	100/100	76/100	IIA		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-32	A2	100/100	76/100	IIA		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-33	A2	100/100	76/100	IIA		209-251-267	96-164	146-157
	PC42-34	A1	90/100	76/100	lc		204-209-251-267	96-120-164	157
	PC42-35	A2	100/100	76/100	lc	EC2.1	209-251-267	96-164	146-157
	PC42-36	A1	100/100	76/100	IIA		204-209-217-251-267	164	146-157
	PC42-37	A1	90/100	76/100	IIA		209-213-251-267	96-164	146-157
	PC42-38	A2	100/100	76/100	IIA		209-251-267	120-164	157
	PC42-39	A1	100/100	76/100	IIA		209-217-251-267	96-164	146-157
PC42-41	A2	90/100	76/100	lc		204-209-251-267	96-164	146-157	

PC 44	3163	A2	100/100	76/100	lc		209-247-267	96-166	157
	3399	A1	100/100	76/100	IA	EC2	209-247-263-283	94-124-166	146-157
	PC44-1	A1	100/100	76/100	lc		209-247-267	96-166	146-157
	PC44-2	A1	100/100	76/100	lc		247-267	96-124-166	146-157
	PC44-3	A1	100/100	76/100	IA		209-247-263-267-283	94-124-166	146-157

	PC44-5	A1	100/100	76/100	lc		209-247-263-267-283	96	146-157
	PC44-6	A1	100/100	76/100	lc		209-247-267	96-124-166	146-157
	PC44-7	A2	100/100	76/100	lc		209-247-267	96	146-157
	PC44-8	A1	100/100	76/100	IA		209-247-263-267-283	96-166	146-157
	PC44-9	A1	100/100	76/100	lc		209-247-263-267-283	96-124-166	146-157
PC 45	3163	A2	100/100	76/100	lc	EC2.1	209-247-267	96-166	157
	3361	A1	90/100	96/100	IIA	EC1	204-213-217	120	146-157
	PC45-2	A1	90/100	96/100	IIA		204-217	120-166	146-157
	PC45-3	A1	100/100	76/100	lc		204-209-217-247-267	96-120-166	157
	PC45-4	A2	90/100	76/100	lc		209-213-247-267	96	146-157
	PC45-5	A1	100/100	76/100	lc		204-209-247-267	96-120-166	146-157
	PC45-6	A2	100/100	76/100	lc		209-217-247-267	96-166	146-157
	PC45-7	A2	90/100	76/100	lc		213-217-247-267	120-166	146-157
	PC45-8	A2	100/100	76/100	lc	EC1	209-213-247-267	96	146-157
	PC45-9	A2	100/100	76/100	lc	EC2.1	209-217	96-120-166	146-157

ANEXO 3:

Dendograma global de Distancias Genéticas.

ANEXO 4:

Listado de Familias analizadas.

CRUCE	AISLAD O	HOSPEDER O	LOCALIDAD	Fecha de colección	# de hijos
C18	3828	HIS	Baños, run tun	18-Ago-2004	4
	3823	BREV	Baños, run tun	18-Ago-2004	
C27	3816	TOMATILLO	Baños, run tun	18-Ago-2004	2
	3607	TBR	Patate	12-Nov-2002	

C29	3785	HIS	Vizc-Patate	3-Apr-2004	7
	3531	TBR	SJM	25-Apr-2002	
C34	3615	ANA	Rio Verde	12-Nov-2002	3
	3807	TBR	Patate	18-Ago-2004	
C35	3615	ANA	Rio Verde	12-Nov-2002	4
	3800	COL	Papallacta	8-Apr-2004	
C37	3541	SPP	Nono	14-Feb-2002	22
	3807	TBR	Patate	18-Ago-2004	
C38	3540	ANA	SJM	25-Apr-2002	6
	3818	TOMATILLO	Baños, run tun	18-Ago-2004	
C39	3540	ANA	SJM	25-Apr-2002	12
	3807	TBR	Patate	18-Ago-2004	
C42	3260	ANA	Chillogallo	17-Apr-1999	40
	3802	TBR	Papallacta	8-Apr-2004	
C44	3163	ANA	Calacali	18-Feb-1998	8
	3399	TOMATILLO	Baños Puyo	19-Jul-2001	
C45	3163	ANA	Calacali	18-Feb-1998	8
	3361	TBR	Baños, run tun	30-May-2001	

ANEXO 5:

Matriz de presencia y ausencia de bandas (1 para presencia y 0 para ausencia), la matriz fue realizada con todos los marcadores utilizados a excepción de los RFLP que se analizaron en otra matriz aparte.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se llegó a estandarizar el método de microsatélites y se obtuvo un protocolo para el análisis del mismo.

El estudio de *Phytophthora infestans* es de suma importancia para la determinación del comportamiento del mismo, y a la vez para su respectivo control.

La alta variabilidad genética de la progenie sugiere que la reproducción sexual es un mecanismo importante, el cual es utilizado por el patógeno para adaptarse al ambiente.

La reproducción sexual puede ocasionar genotipos más agresivos que se adapten con facilidad a varios nichos ecológicos.

Al estudiar cada locus de forma independiente, se demostró que la gran mayoría de individuos obtenidos en la progenie se produjeron de forma sexual, debido a la diversidad existente en la misma.

No se puede decir que la población obtenida es idéntica a sus progenitores, por el análisis de distancias que localiza a cada padre de manera independiente.

Existe también la presencia de familias en la que casi todos sus hijos se parecen a uno de los padres (A2), pero esto se da en un porcentaje muy bajo en comparación con toda la progenie.

El análisis de Pep indica que la mayoría de la progenie, tiene tendencia a 76/100. La prueba de Gpi no nos da amplitud en los análisis debido a que no se puede observar la presencia de híbridos con los resultados, al contrario con el análisis de SSR podemos ver una alta diversidad de cada uno de los locus, brindando genotipos diferentes en cada una de las familias.

Los análisis estadísticos de algunos marcadores demuestran que la población no se rige a una proporción mendeliana en el caso de familias con mayor número de hijos, al contrario sucede con familias que poseen una cantidad de hijos menor.

Cada marcador molecular cumple un papel importante en la caracterización de la progenie, se determinó que el análisis de microsatélites brinda mayor cantidad de información en comparación del análisis de RFLP.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios de adaptabilidad a nuevos hospederos.

Se debería tomar como referencia la técnica de microsatélites para la determinación de nuevos genotipos y estudiar la relación existente entre estos y las características fenotípicas de los aislados.

Se podría repetir los estudios realizados con otros aislamientos no solo del Ecuador sino de países cercanos que tengan la presencia del tipo de apareamiento A2, para así formar una base de datos de polimorfismos del patógeno y en un futuro realizar monitoreos de las regiones que han sido estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, N., Erselius, L., Chacón, M., Flier, W., Ordoñez, M., Kroon, L., y Forbes, G. 2004. Genetic Diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador Provides New Insight Into de Origin of This Important Plant Pathogen. *Phytopathol.* 94: 154-162.
- Anderson, J., y Kohn, L. 1995. Clonality in solborne, plant-pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytoopathol.* 33:369-391.
- Andrade, H., Cuesta, X., Oyarzun, P. (en linea) 1998.. Mejoramiento participativo en Ecuador aplicado al incremento de la severidad de *Phytophthora infestans* en el INIAP <http://www.prgaprogram.org/cds/fmp/NADINE-PDF/ANDRADE.pdf>.
- Brasier, C., y Hansen, E.. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*. I: genetic system, sexuality and the generation of variation. *Annual Review of Phytopathol.* 30:153-171.
- Brasier, C., Cooke, D., Duncan, J. 1999. Origin of new *Phytophthora* pathogen trough interspecific hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5878-5883.

- Carter, D., Archer, S. y Buck, K. 1990. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans* . Mycol. Res. 94:1123-1128.
- Chang, T, Ko. 1991. Factors affecting germination of oospores of *Phytophthora infestans*. Journal of Phytopathol. 133:29-35.
- Creste, S., Tulmann, N., y Figueira, A. 2001. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining Plant Molecular Biology Reporte 19:299-306.
- Claros Díaz, M. Marcadores moleculares: Qué son?, cómo se obtienen? y para qué valen? (en línea) 2002. Universidad de Málaga www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS49/marcadores.html.
- Drenth, A. 1994. Molecular genetic evidence for a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in Europe.
- Dobrowolski, M., Tommerup, I., Shearer, B., y O'Brien, P. Three Clonal Lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia Revealed by Microsatellites (en línea) 2002. <www.apsnet.org/phyto/pdfs/2003/0408-01R.pdf>.

- Echemendia, Y., 2002. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical.
- Erselius, L., Hohl, H., Ordoñez, M., Jarrín, F., Velasco, A., Ramon, M. y Forbes, G. 1999. Genetic diversity among isolates of *Phytophthora infestans* from various hosts in Ecuador. Program Report. International Potato Center. Pages 39-48.
- Erwin, D. y Ribeiro O. 1996a. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (1876). *Phytophthora Diseases Worldwide*. D. C. Erwin and O. K. Ribeiro. St. Paul, Minnesota, APS Press: 346-353.
- Erwin, D., y Ribero, K. 1996b. *Phytophthora Diseases Worldwide*. Minnesota (USA), APS press, pp346-353.
- Forbes. G, 1997a. Manual for Laboratory Work on *Phytophthora infestans*, Centro Internacional de la Papa. CIP Training manual. Quito, Ecuador.
- Forbes, G., Escobar, X., Ayala, C., Revelo, J., Ordoñez, M., Fry, B., Doucett, K., and Fry, W. 1997b. Population Genetic Structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology*. 87:375-380.

- Forbes, G., Goodwin, S., Drenth, A., Oyarzun, P., Ordóñez, M. y Fry, W. . 1998. A Global Marker database for *Phytophthora infestans*. Plant Disease 82:811-818.
- Fry, W., Drenth, A., Spielman, L., Mantel, B., Davidse, L., y Goodwin, S. 1991. Population genetics structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. Phytopathol. 81: 1330-1336.
- Fry, W., Goodwin S., Matuszak J., Spielman, L., Milgroom, M. y Drenth, A. 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. Annual Review of Phytopathology 30:107-129.
- Fry, W., Goodwin, S., Dyer, A., Matuszak, J., Drenth, A., Tooley, P., Sujkowski, L. Koh, Y., Cohen, B., Spielman, L., Deahl, K., Inglis, D., y Sandlan, K. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. Plant Disease 77: 653-661.
- Gavino, P., Smart, C., Sndrock, W., Miller, J., Hamm, P., Lee, T., Davis, R., Fry, W. 2000. Implications of sexual recombination for *Phytophthora infestans* in United States: generation of an aggressive lineage. Plant Dis. 84:731-735.

- Goodwin, S., Sujkowski, I., Dyer, A., Fry, B., y Fry, W. 1995a. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North Arnerica. *Phytopathology* 85:473-479.
- Goodwin, S., Sujkowski, L., y Fry, W. 1995b. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology* 85:669-676.
- Goodwin, S., Ludwik, S., Sujkowski., S y Fry, W. 1996. Widespread distribution and probable origen of resistance to metalaxil in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathol.* 86:793-800.
- Goodwin, S. 1997, The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathol.* 81: 462-473.
- Griffith, G., y Shaw, D. 1998. Polymorfism in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected following PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions.. *Microbiol.* 64:4007 – 4014.
- Griffiths, A. y Col. (en linea) 2000. An introduction to Genetic Analysis. Freeman. New York [http://www.intech.gov.ar/IIB-INTECH/html/docencia/BioVegetal/marcadores%20moleculares%20\(uno\).pdf](http://www.intech.gov.ar/IIB-INTECH/html/docencia/BioVegetal/marcadores%20moleculares%20(uno).pdf).

- Hartl D., Clarck A. 1994. Principles of Populations Genetics. 2Ed. Sinauer Associates.
- Informe Anual Cip. (en linea) 1998. Fotos sobre patología, Redepapa <http://www.redepapa.org/oosporas1.html>.
- Jaramillo, S. (en linea) 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín. <http://reuna.unalmed.edu.co/temporales/memorias/Monografia.pdf>.
- Judelson, H. 1997. The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge, Fungal Genet. And Biol. 22:65-76.
- Khaki, I. 1971. Genetical evidence for diploidy in *Phytophthora*. *Genet. Res.* 17:165- 167.
- Knapova, G., Tenzer, I., Gessler, C. y Gisi, U. 2001. characterisation of *Phytophthora infestans* from potato and tomato with molecular markers Biodiversity in Plant Pathology, Proceedings of the 5 th Congress of the European Foundation for Plant Pathology.

- Kimball, J. (en línea) 2005. Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). < <http://www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224/loose.dtd>>
- Maldonado, L., Delgado, M., y Garcia, C. Estudio de la Estructura Genética de las Poblaciones de *Phytophthora Infestans* En Las Regiones Productoras de Papa En Colombia (en línea) 1999. <http://66.102.7.104/search?q=cache:dEMtFC4atqQJ:www.redepapa.org/infestans3.pdf++phytophthora+%2B+ciclo&hl=es -->>.
- Niederhauser, J. 1961. Genetic studies of *Phytophthora infestans* and *Solanum* species in relation to late-blight resistance in potato. *Phytopathol.* 1:491-497.
- Oliva, R. 2001 Compatibilidad sexual entre aislados de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary y caracterización de la progenie F1. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito – Ecuador.
- Oliva, R., Erselius, L., Adler, N., Forbes, G. 2002. Potencial of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador, *Plant pathol.* 51:710-719.
- Ordóñez, M., Hohl, H., Velasco, J., Ramon, M., Oyarzum, P., Smart, C., Fry, W., Forbes, G. y Erselius, L. 2000. A Novel Population of

Phytophthora, Similar to *Phytophthora infestans* Attacks Wild *Solanum* Species in Ecuador. *Phytopathol.* 90: 197-202.

- Ospina-Giraldo, M. y Jones, R. 2003. Characterization of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Phytophthora infestans* reveals the presence of multiple alleles. *Fungal Genetics and Biology* 40:197-206.
- Oyarzun, P., Taípe, J., y Forbes, G. (en línea) 2001. *Phytophthora infestans* activity and particularities in Ecuador. <http://gilb.cip.cgiar.org/downloads/Others/Taller2001/1.3%20P.i.%20su%20actividad%20y%20particularidades%20en%20el%20Ecuador%20perfil%20de%20paisOK.pdf>.
- Perez, M. 1998. Sequential bulked typing: a rapid approach for detecting QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 96, 551—557.
- Pozo, A. 1997. Comparación entre poblaciones de *Phytophthora infestans* en tomate (*Lycopersicon esculentum*) y papa (*Solanum tuberosum*) en Ecuador. Tesis de Ingeniería Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas. Quito – Ecuador.
- Reis, A., Smart, C., Fry, W., Maffia, L. y Mizubuti, E. Characterization of Isolates of *Phytophthora infestans* from Southern and Southeastern

Brazil from 1998 to 2000 (en línea) 2000 <
<http://www.apsnet.org/pd/pdfs/2003/0522-03R.pdf> >.

- Ritter, E., Lucca, F., Sanchez, I., Ruiz, J., Aragonés, A., Castanon, S., Bryan, G., Waugh, R., Lefebvre, V., Rouselle-Burgoise, F., Gebhardt, C., Eck, H., Os, H., Taco, J., y Bakker, J., 2004. Recursos Genómicos en la Papa y Posibilidades de su Explotación, Suplemento Revista Latinoamericana de la papa España.

- Robertson, N. 1991. The Challenge of *Phytophthora infestans*. Advance of Plant Pathology, Vol 7: *Phytophthora infestans* : The cause of Light Blight of Potato. (D.S. Ingram. P.H. Williams, eds). Academia Press, San Diego, USA.

- Rodríguez, D. 1996. Candelilla tardía de la papa y el tomate: un viejo problema de continua vigencia, FONAIAP Estación Experimental Trujillo, Pampanito, Trujillo.

- Roca y Ramirez, (en línea) 1999. Las Musáceas, Microsatélites <http://www.monografias.com/trabajos19/musaceas/musaceas.shtml>.

- Romagna, E. (en línea) 2006. Peronospora della patata e del pomodoro (*Phytophthora infestans*) Servizio Fitosanitario

http://www.ermesagricoltura.it/wcm/ermesagricoltura/fitosanitario/avversita/peronospora_patata_pomodoro.htm.

- Sansome, E. y C. Basier. 1973. Diploidy and chromosomal structural hybridity in *P infestans*. *Nat.* 241:344-345.
- Samaucha, Y., y Gisi, U. 1987. Use of two- and three-way mixtures to prevent development of resistance to phenylamide fungicides in *Phytophthora* and *Plasmopora*. *Phytopathol* 77:1405-1409.
- Shaw, D. 1983. The Peronosporales-a fungal geneticist's nightmare. *In* Zoosporic Plant Pathogens: A Modern Perspective. S. T. Buczacki ,USA. p. 85-121.
- Spielman, L., Drenth, A., Davidse, L., Sujkowski, L., Gu, W., Tooley, P., Fry, W. 1991. A Second World-Wide Migration and Population Displacement of *Phytophthora infestans*?. *Plant Pathol.* 84:201-207.
- Tanksley, S., Young, N., Paterson, A., y Bonierbale, M. 1989. RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for and old science. *Biotechnol.* 7: 257-263.

- Therrien, C., Tooley, P., Spielman, L., Fry, W. , Rith, D.. y Shelly, S. 1993. Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. *Mycol. Res.* 97:945-950.
- Tooley, P. y Villarreal, M. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans*. *Journal of Heredity* 76:431-435.
- Vera, G., Shattock, R., Bustamante, E. (en linea) 2000. Caracterizacion de aislamientos de *Phytophthora infestans* nativos en Costa Rica <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip55/art6-a.htm#Introducción>.
- William E. Fry W. (en linea) 1997. *Plant Epidemiology*, The American phytopatological society . (<http://www.apsnet.org/online/lateblite/papers/lb001.htm>).
- Wei, H., Jun, W., Chujoy, E., Yanli,Y., Yi, W.,Zhiming, Z., Kiyun X. (en linea) 1998. Potato Late Blight (*Phytophthora infestans*) situation in Asia with Special Reference to China <http://gilb.cip.cgiar.org/downloads/Gilb99/08wei.pdf>.
- Zhang, Z., Zhu, J., Song, B., Li, Y., Tian, S., y Jiang, H., 2001. Further investigation on A2 mating type of *Phytophthora infestans* in China. *Journal of Agricultural University of Hebei*.

- Zentmyer, G. 1985. The world of Phytophthora. Páginas 1-7. En: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. Eds. D. C. Ewin, S. BartnickGarcia, P. H. Tsao. U.S.A.