



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y  
MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE  
*Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS  
DE HUERTOS DE AGUACATE DEL  
DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA,  
COLOMBIA**

**Cristina Calle Henao**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Medellín, Colombia

2017



# **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA**

**Cristina Calle Henao**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Agrarias**

Directora:

PhD. MsC, Bióloga. Clara Inés Saldamando Benjumea

Codirectora:

PhD. MsC, Ing. Agrónoma. Elena Paola González Jaimes

Línea de Investigación:

Salud Pública Vegetal – Fitopatología

Grupos de Investigación:

Fitosanidad y Control Biológico (CIB)

Bioteología Vegetal UNALMED-CIB

Sistemas Agrícolas Tropicales (PCJIC)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2017



# Agradecimientos

A mi directora, la doctora Clara Inés Saldamando, porque sin conocerme, me dio todo su apoyo cuando más lo necesitaba, me dedicó todo su tiempo y me brindó todo su conocimiento.

A mi codirectora, la doctora Elena Paola González Jaimes, y a su equipo de trabajo en el laboratorio de Sanidad Vegetal del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, por darme la oportunidad de continuar mi trabajo con ustedes y brindarme los recursos económicos y logísticos para terminar mi investigación. Gracias a Leo Galindo, a Cata, a Luz, a Verónica y a Mariana por su amistad y compañía.

A la Corporación para Investigaciones Biológicas, especialmente a la Unidad de Fitosanidad y Control Biológico, porque me abrieron las puertas para empezar a formarme como investigadora y me han llenado de experiencias, de logros e incluso de caídas y frustraciones que me han permitido seguir formándome como persona

Al proyecto “Desarrollo tecnológico, productivo y comercial del aguacate en Antioquia” y al Sistema General de Regalías de Antioquia por patrocinar esta investigación.

Al doctor Rafael Eduardo Arango Isaza y a todo su grupo de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB, por iniciarme en el mundo de la biología molecular. Gracias por todas sus enseñanzas, por su paciencia, amistad y su comprensión. Gracias profe porque lo que ha hecho por mí, no lo hace cualquiera.

Gracias especiales a mis amigos de la CIB, a todos los que por allí han pasado dejando una huella en mí, acompañándome en todo momento hasta casi volverse parte de mi familia. Gracias a Felipe, a Marcela, a Paola, a David, a Tatiana, a Julián, a Kate, a Daniela, a Lore, a Sara, a Naty, a Lina, a Davinson, a Aleja, a María y a todos los que esté olvidando, pero que, con su apoyo, palabras de aliento y motivación, me mantuvieron de pie, trabajando, sin renunciar. Con ustedes he pasado los mejores años de mi vida y he vivido experiencias que nunca imaginé poder vivir.

Por último, y lo más importante, gracias infinitas a mi familia por su paciencia y por todo el amor, a mis padres porque siempre me han apoyado, con cada sueño, cada meta, siempre han creído en mí y, con su ejemplo, me han enseñado a dar lo mejor hasta el final. A mis hermanos que son mis confidentes y mis mejores amigos.



## Resumen

La pudrición de la raíz o tristeza del aguacatero, representa una de las enfermedades más devastadoras del aguacate y es causada por *Phytophthora cinnamomi* Rands, un oomicete heterotálico que habita en suelos cálidos y húmedos e infecta el sistema radicular del árbol. En Colombia, poco se sabe acerca del fitopatógeno y su incidencia en los cultivos de aguacate (*Persea americana*), sin embargo, ha sido reconocido como el principal agente causal de la pudrición de raíz, por lo que la apuesta exportadora de este cultivo en el departamento de Antioquia, requiere de mejoras en las estrategias de manejo aplicadas en esta especie. El uso de árboles criollos resistentes o tolerantes a *P. cinnamomi* ha sido propuesto como portainjertos de la variedad Hass, para ello es necesario tener un mayor conocimiento genético y fenotípico de las poblaciones de este fitopatógeno en nuestro país con el fin de conseguir una resistencia duradera en este cultivo. En este trabajo se caracterizó una colección de 112 aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de cultivos de aguacate de las subregiones productoras más importantes de aguacate en Antioquia. Estos aislamientos fueron caracterizados a nivel de colonia, en cuanto a su forma, crecimiento y tamaño, en condiciones de laboratorio, y fueron analizados con marcadores moleculares del genoma nuclear (secuencias de la región interna transcripta - ITS) y del mitocondrial (PCR-RFLP de regiones intergénicas). Las colonias de los aislamientos de *P. cinnamomi*, presentaron tres morfologías: roseta, la más abundante, estrella y sin patrón; con tasas de crecimiento entre 0.293 y 1.126 cm/d y diámetros de 3.31 a 7.97 cm. Se encontró que hay una baja diferenciación genética entre las subpoblaciones del departamento de Antioquia ( $F_{ST} = -0.01190$ ,  $P > 0.05$  para el ITS;  $F_{ST} = 0.002$ ,  $P > 0.05$  para las regiones intergénicas), lo cual podría explicarse por la predominancia de la reproducción clonal (92.8% de los aislamientos). No obstante, según un análisis bayesiano poblacional, los aislamientos se agruparon en cinco *clusters* ( $K = 5$ ) con los análisis de los marcadores mitocondriales y en cinco haplotipos según las secuencias de la región ITS. Dos haplotipos relevantes fueron obtenidos en Antioquia, uno de ellos se encontró asociado a cultivos de aguacate y a otros árboles madereros y ornamentales de secuencias de ITS del fitopatógeno obtenidas del GenBank de diversos países del mundo. Por otro lado, el segundo haplotipo solo se encontró asociado a cultivos de aguacate de Antioquia. Esto sugiere que las poblaciones del fitopatógeno pudieron tener dos orígenes en este departamento, el primero de otros hospederos y el segundo exclusivamente de cultivares de aguacate. El test de Neutralidad de Tajima mostró que las poblaciones de este fitopatógeno han permanecido de tamaño constante. Cuando fueron comparados con aislamientos de otros países y hospederos, se encontró que *P. cinnamomi* sí presenta una estructura poblacional ( $F_{ST} = 0.45709$ ,  $P < 0.000001$ ) en el mundo, causada posiblemente por un distanciamiento geográfico. Dado que no se encontró una

relación contundente entre las características morfológicas y moleculares estudiadas, se contempla la posibilidad de que sea la plasticidad fenotípica la que permita explicar la amplia distribución del fitopatógeno y su creciente rango de hospederos. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales tanto fenotípicos (caracteres microscópicos, la sensibilidad a fungicidas y pruebas de patogenicidad) como moleculares, con marcadores adicionales, sobre poblaciones de toda Colombia.

**Palabras clave:** Aguacate, *P. cinnamomi*, morfología, genética, estructura poblacional, clonalidad.

## Abstract

The root rot or “la tristeza del aguacatero” represents one of the most devastating diseases of avocado and is caused by *Phytophthora cinnamomi* Rands, a heterothallic oomycete that inhabits the warm soak soils, infecting the root system of the tree. In Colombia, little is known about this phytopathogen and its incidence in the avocado crops (*Persea americana*). However, the phytopathogen has been recognized as the principal cause of the root rot. Antioquia’s growing and exporting avocado industries require an improvement of the management strategies applied on this species. The use of native trees that are resistant or tolerant to *P. cinnamomi* has been proposed as rootstock of the Hass variety. Therefore, a better understanding of the genetic and phenotypic information of the population’s species in Colombia is necessary in order to achieve durable resistances in this crop. In this work, a collection of 112 isolates of *P. cinnamomi*, obtained from the most important producer subregions of avocado in Antioquia, was characterized. These isolates were characterized in terms of shape, growth and size, under laboratory conditions, they were also analyzed with two molecular markers: nuclear (sequences of ITS region) and mitochondrial (PCR-RFLP of intergenic regions). Colonies of the *P. cinnamomi* isolates presented three morphologies: rosaceous, the most abundant, stellate and without pattern. The rate of growth varied between 0.293 and 1.126 cm/d, with colony diameters from 3.31 to 7.97 cm. Low genetic differentiation between the subpopulations of the Antioquia department ( $F_{ST} = -0.01190$ ,  $P > 0.05$  for the ITS;  $F_{ST} = 0.002$ ,  $P > 0.05$  for the intergenic regions) was found with a predominant clonal reproduction (92.9% of the isolates). Nevertheless, according to a population Bayesian analysis, the isolates were grouped in five clusters ( $K=5$ ) with the analysis of the mitochondrial markers and in five haplotypes according to the sequences of the ITS region. Two relevant haplotypes were obtained in Antioquia, one of them associated with ITS sequences of strains found in GenBank associated with avocado crops, forest and ornamental trees obtained from different countries of the world. The second haplotype was found only associated with avocado crops in Antioquia. This suggests that the populations of the phytopathogen could have had two origins in Antioquia, the first one from other hosts and the second exclusively from the avocado tree. The Tajima's test of neutrality showed that the populations of this phytopathogen have remained of the same size. When isolates of Antioquia were compared to isolates from other countries and hosts, it was found that *P. cinnamomi* did present a population structure ( $F_{ST} = 0.45709$ ,  $P < 0.000001$ ) in the world caused by a geographic separation. No relation between morphological and molecular characteristics analyzed was found, there is a possibility that the phenotypic plasticity would allow an explanation to the wide distribution of the phytopathogen and its increasing range of

hosts. These findings require additional phenotypic (microscopic characters, fungicide sensitivity and pathogenic tests) and molecular studies, with other markers, on populations all over Colombia

**Keywords:** Avocado, *P. cinnamomi*, morphology, genetic, population structure, clonality.

# Contenido

	Pág.
Resumen.....	VII
Abstract.....	IX
Contenido.....	XI
Lista de figuras.....	IXIII
Lista de tablas.....	XIV
<b>1. Introducción .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Justificación .....</b>	<b>19</b>
<b>3. Marco teórico y revisión de literatura.....</b>	<b>24</b>
A    Generalidades del aguacate .....	24
B    Generalidades de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	25
i)    Taxonomía y clasificación .....	25
ii)   Antecedentes históricos del origen y migraciones del fitopatógeno .....	26
iii)  Características morfológicas .....	27
(a)  Micelio.....	27
(b)  Zoosporangios .....	27
(c)  Zoosporas.....	28
(d)  Clamidosporas .....	28
(e)  Órganos sexuales .....	28
iv)  Biología y ciclo de la enfermedad.....	29
v)  Factores del ambiente que inciden en la distribución de <i>P. cinnamomi</i> .....	29
(a)  Temperatura.....	30
(b)  Agua .....	30
(c)  pH .....	30
(d)  Tipo de suelo y nutrientes.....	30
vi)  Características de la enfermedad y daños usados.....	31
vii)  Detección de <i>P. cinnamomi</i> en cultivos de aguacate.....	32
(a)  Cultivo en placa, trampeo o combinación de ambas.....	33
(b)  Pruebas serológicas .....	33
(c)  Pruebas moleculares .....	33
viii)  Diversidad genética y estructura poblacional de <i>P. cinnamomi</i> utilizando marcadores moleculares .....	34
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>39</b>
A.    Objetivo general.....	39
B.    Objetivos específicos .....	39
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>40</b>
<b>6. Materiales y métodos .....</b>	<b>42</b>
A.    Establecimiento de una colección de <i>P. cinnamomi</i> .....	42
B.    Extracción de ADN.....	43

C.	Amplificación y secuenciación de la región ITS.....	44
D.	PCR-RFLP de las regiones <i>trnG-rns</i> y <i>rns-nad3</i> del ADN mitocondrial .....	44
E.	Análisis fenotípico .....	45
F.	Análisis de genética de poblaciones.....	46
<b>7.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>53</b>
A.	Establecimiento de una colección de <i>P. cinnamomi</i> .....	53
B.	Secuenciación.....	54
C.	Análisis fenotípico .....	54
D.	Análisis de genética de poblaciones a partir de ADNr.....	57
E.	Análisis de genética de poblaciones por PCR-RFLP a partir de ADNmt .....	62
F.	Relación entre las características morfológicas culturales y moleculares de aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> de Antioquia.....	66
<b>8.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>71</b>
A.	Establecimiento de una colección de <i>P. cinnamomi</i> .....	71
B.	Análisis fenotípico .....	72
C.	Análisis de la genética de poblaciones a partir de ADNr y una PCR-RFPL de las regiones intergénicas <i>trnG-rns</i> y <i>rns-nad3</i> del ADN mitocondrial.....	75
D.	Relación entre las características morfológicas culturales y moleculares de aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> de Antioquia.....	80
<b>9.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b>Perspectivas y recomendaciones.....</b>	<b>84</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>85</b>
<b>12.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>97</b>

# Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura del genoma mitocondrial en <i>P. infestans</i> .....	37
<b>Figura 2.</b> Estructura de los genes ribosomales en eucariotas y sitios de unión de los cebadores universales basados en las secuencias de las regiones ITS.....	38
<b>Figura 3.</b> Aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> exhibiendo una morfología de colonia en roseta, en estrella y sin patrón en medio PDA.....	55
<b>Figura 4.</b> Efecto de la morfología de las colonias y del estado del árbol sobre el tamaño de las colonias.....	57
<b>Figura 5.</b> Número de individuos pertenecientes a cada uno de los haplotipos de <i>P. cinnamomi</i> encontrados en diferentes poblaciones del mundo.....	58
<b>Figura 6.</b> Red haplotípica obtenida para las secuencias de <i>P. cinnamomi</i> de diferentes partes del mundo.....	59
<b>Figura 7.</b> Árbol de Neighbor Joining (NJ) obtenido con los valores $F_{ST}$ pareados de la región ITS...60	60
<b>Figura 8.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% para la visualización de los productos de la amplificación de las regiones intergénicas <i>rns-nad3</i> y <i>trnG-rns</i> .....	62
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para la visualización de los productos de la digestión de región intergénica <i>rns-nad3</i> con <i>SwaI</i> y <i>MwoI</i> .....	62
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para la visualización de los productos de la digestión de región intergénica <i>trnG-rns</i> con <i>PsiI</i> .....	63
<b>Figura 11.</b> Árbol de Neighbor Joining obtenido con los valores pareados de la distancia de Nei.....	64
<b>Figura 12.</b> Análisis de agrupamiento bayesiano realizado mediante el <i>software</i> STRUCTURE, para <i>P. cinnamomi</i> procedente de Antioquia.....	65
<b>Figura 13.</b> Efecto del haplotipo sobre el crecimiento de las colonias.....	67
<b>Figura 14.</b> Efecto del haplotipo sobre el tamaño de las colonias.....	68

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Tamaños de banda (pb) esperados de la digestión del producto de la amplificación de las regiones <i>rns-nad3</i> y <i>trnG-rns</i> con las enzimas de restricción <i>SwaI</i> , <i>MwoI</i> y <i>PsiI</i> .....	45
<b>Tabla 2.</b> Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	48
<b>Tabla 3.</b> Relación de las muestras totales analizadas.....	53
<b>Tabla 4.</b> Crecimiento promedio y desviaciones estándar de colonias de aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> agrupados por morfología de la colonia, origen geográfico, condición fitosanitaria del árbol hospedero y cultivar.....	55
<b>Tabla 5.</b> Efecto de la subregión de origen, cultivar, condición fitosanitaria del árbol y morfología de la colonia sobre el diámetro promedio de las colonias de <i>P. cinnamomi</i> .....	56
<b>Tabla 6.</b> Análisis de Varianza Molecular realizado en 109 secuencias de ADN de <i>P. cinnamomi</i> del departamento de Antioquia.....	57
<b>Tabla 7.</b> Análisis de Varianza Molecular realizado en 210 secuencias de ADN de <i>P. cinnamomi</i> de diferentes partes del mundo.....	60
<b>Tabla 8.</b> Test de neutralidad Tajima-Nei desarrollado para <i>P. cinnamomi</i> en 14 países.....	61
<b>Tabla 9.</b> Análisis de Varianza Molecular realizado en 112 aislamientos de <i>P. cinnamomi</i> del departamento de Antioquia.....	63
<b>Tabla 10.</b> Clonalidad y diversidad genotípica de las poblaciones de <i>P. cinnamomi</i> analizados en Antioquia por PCR-RFLP.....	64
<b>Tabla 11.</b> Test de Evanno realizado con todos los individuos de <i>P. cinnamomi</i> para determinar el número de <i>clusters</i> (K).....	65
<b>Tabla 12.</b> Análisis de Varianza para el efecto del haplotipo y los productos de PCR-RFLP sobre la velocidad promedio de crecimiento de las colonias de <i>P. cinnamomi</i> .....	66
<b>Tabla 13.</b> Análisis de Varianza para el efecto del haplotipo y el PCR-RFLP sobre el tamaño de las colonias de <i>P. cinnamomi</i> .....	67
<b>Tabla 14.</b> Comparación entre los estimadores $F_{ST}$ (caracteres moleculares) y $Q_{ST}$ (caracteres cuantitativos) de las poblaciones de <i>P. cinnamomi</i> de Antioquia.....	68
<b>Tabla 15.</b> Prueba ji-Cuadrado de Pearson para evaluar el efecto de la subregión de origen, el cultivar y el estado fitosanitario de los hospederos sobre el haplotipo, el genotipo generado por la PCR-RFLP y la morfología.....	69

# 1. Introducción

El aguacate es una fruta de creciente importancia económica en el mercado mundial, dado su exquisito sabor, consistencia, alto valor nutricional y potencial para ser usado en otras industrias como la cosmética, la farmacéutica e incluso la bioenergética (Forero, García & Cárdenas, 2007; Risnoyatiningih, 2010). Además, el cultivo de aguacate cuenta con una amplia distribución a nivel geográfico, lo que posibilita disponer de una oferta casi permanente del producto durante diferentes épocas del año. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT, 2017) estima que para el 2014 la producción mundial de aguacate llegó a 5028756 toneladas, de las cuales el 70.3% correspondieron al continente americano siendo México, República Dominicana y Perú, los tres principales productores, mientras que Indonesia se ubicó en el cuarto puesto y Colombia en el quinto (FAOSTAT, 2017). En los últimos años, el cultivo ha experimentado un crecimiento exponencial, dado que este ha demostrado una alta rentabilidad, tanto para la venta local como para la exportación; de igual manera su fácil aclimatación y rusticidad han permitido que su producción se extienda a otros países de clima tropical, subtropical e incluso a países de clima templado (Ruiz, 1912; Cámara de Comercio de Medellín para Antioquia, 2011; Ministerio de Industria y Comercio - Mincit, 2016).

Colombia cuenta con más de 30 mil hectáreas sembradas, representando el 6.38% de la producción global (Red de Información y Comunicación Estratégica del Sector Agropecuario – AGRONET, 2017; FAOSTAT, 2017), las cuales hasta ahora se han destinado a cubrir la también creciente demanda interna de aguacate. No obstante, dado su gran potencial de exportación, han comenzado a explorarse oportunidades para su comercialización en países como Estados Unidos, Países Bajos, Francia, Japón, y Canadá en los que el consumo de aguacate aumenta vertiginosamente (Cámara de Comercio de Medellín para Antioquia, 2011; FAO, 2017).

La intensidad de la competencia en el mercado, obliga a los productores de aguacate a garantizar frutos de la más alta calidad, impecables y libres de enfermedades; este último factor limita significativamente su distribución, debido a que durante el desarrollo del cultivo se pueden presentar numerosas enfermedades causadas por fitopatógenos que menoscaban la calidad del producto, generando importantes pérdidas económicas (Marais, 2004). En el aguacate, las enfermedades parasíticas más conocidas son de origen fúngico e incluyen la pudrición de la raíz, marchitamiento, pudrición de frutos, gomosis, entre otras (Tamayo, 2007; Schaffer, Wolstenholme & Whiley, 2013).

La tristeza del aguacatero representa una de las enfermedades más devastadoras del aguacate (Ochoa et al. 2007; Ochoa et al. 2009). Es causada principalmente por *Phytophthora cinnamomi* Rands., un oomicete heterotálico que habita en suelos cálidos y húmedos en los cuales infecta el sistema radicular de los árboles a través de zoosporangios adaptados específicamente para dispersión sobre grandes distancias, de zoosporas biflageladas capaces de detectar a un hospedero por quimiotaxis, o de clamidosporas, que además le ayudan a sobrevivir en el suelo, en desechos y tejidos vegetales necrosados (Echemendia, 2002; Jaramillo, 2003), donde permanece hasta encontrar condiciones favorables para su germinación (Kong, Hong & Richardson, 2003). Todas estas características dificultan en gran medida el desarrollo de técnicas de control del microorganismo, lo que ocasiona pérdidas económicas extensivas para la agricultura y lo convierten en una gran amenaza para los ecosistemas naturales y la biodiversidad (Hardham, 2005). Así lo han reportado países como México, el principal productor de aguacate, donde esta enfermedad afecta al 5% de la superficie cultivada con la fruta, calculando daños del 8% al 15% en plantaciones (Ochoa et al. 2007; Ochoa et al. 2009; Carranza et al. 2015). En Oceanía, de donde se cree que es oriundo este fitopatógeno, no solo ataca especies de *Persea* sp. sino que amenaza con llevar a la extinción a otras especies de plantas nativas obligando al Gobierno Nacional a desarrollar en el 2009 el “*Threat Abatement Plan for Dieback Caused by the Root-Rot Fungus P. cinnamomi*” una iniciativa que pretende minimizar el impacto del fitopatógeno (Zentmyer, 1977; Gobierno Australiano, 2009). Así se le puede encontrar en cerca de 70 países del mundo. (Echemendia, 2002; Sánchez, 2007).

En Colombia, es poco lo que se conoce acerca del impacto que tiene *P. cinnamomi* sobre los cultivos de aguacate, su origen o causas. Corpoica calcula que en nuestro país este fitopatógeno genera pérdidas del 30-50% de los árboles en etapa de vivero y establecimiento de cultivo (Tamayo, 2007; Ramírez, Castañeda & Morales, 2014), pero se presenta en cualquier estado de desarrollo de la planta y ha sido identificado en los departamentos de Antioquia, Bolívar, Caldas, Cesar, Cundinamarca, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca (Rodríguez, Jaramillo & Orozco, 2009). El Instituto Colombiano de Agricultura (ICA, 2009), ha asociado la diseminación de la enfermedad con el uso de material no certificado, suelos pesados y mal drenados y su detección tardía en los huertos. Esto indica que, dada las escasas medidas de control efectivas con las que se cuenta, deben articularse estrategias integradas que incluyan actividades de pre y post-cultivo (Violi et al. 2009), para evitar un avance de la enfermedad que obligue, finalmente, a la erradicación de los árboles afectados. Así sucedió en los Montes de María (Bolívar) en el año 2009, donde fueron erradicados seis mil árboles

de aguacate que presentaban pudrición en la raíz y otros síntomas característicos de la enfermedad causada por *P. cinnamomi* (ICA, 2009).

El uso de cultivares resistentes se perfila como la alternativa más promisoría en el manejo de enfermedades de plantas causadas por agentes bióticos (Silva, 2011); debido a que permiten contar con materiales superiores en rendimiento, calidad y con resistencia a enfermedades que limitan la producción, para aumentar así la competitividad de los agricultores (Sánchez, 2007; Rodríguez et al. 2009). No obstante, en Colombia la cadena de aguacate no cuenta con un programa de certificación de materiales para propagación vegetativa, por lo tanto, las semillas utilizadas para producir los patrones o porta injertos son de origen desconocido, en la mayoría de los casos, susceptibles a pudriciones radicales causadas principalmente por *P. cinnamomi* (Rodríguez et al. 2009). En consecuencia, la identificación e incorporación de cultivares de aguacate resistentes al fitopatógeno, son objetivos de los programas de mejoramiento del país desarrollados por Corpoica, el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, centros de investigación y otras organizaciones del gremio aguacatero.

Dado que la resistencia de un cultivo a un patógeno depende en gran parte de las variantes de este último, en este trabajo se realizó una caracterización molecular, morfológica y un análisis de diferenciación genética de las poblaciones de *P. cinnamomi* en el departamento de Antioquia.

Se conoce que existen diferentes situaciones que pueden dar lugar a variaciones, ya sean de tipo fenotípico, genético o patogénico dentro de la especie, entre ellas se cuentan:

- 1) La relación existente entre las características de la especie y el medio ambiente en el que se desarrolla, cuyas condiciones particulares difieren en temperatura, disponibilidad de nutrientes, pH, presencia de poblaciones antagónicas e inciden también sobre las tasas de crecimiento, producción y tamaño de esporangio, zoosporas y clamidosporas y sobre la patogenicidad (Zentmyer et al. 1976; Sánchez, 2007).
- 2) La ocurrencia de los dos tipos de apareamiento A1 y A2 en una misma localidad, lo cual proporciona oportunidades para la reproducción sexual y la posible adquisición de nuevos genotipos que dan lugar a más patotipos.

- 3) Variaciones en el comportamiento de individuos, evaluadas a nivel macro y microscópico en condiciones de laboratorio, de relevancia a nivel fisiológico y parasitario (Shepherd, Pratt & Taylor, 1974; Ristaino et al. 1998; Ochoa et al. 2007).
- 4) Otras fuentes potenciales de variación genética que aún deben ser estudiadas son: la hibridación interespecífica con otras especies, las mutaciones, las migraciones, la selección, entre otras (Kong et al. 2003).

Lo anterior hace necesario el desarrollo de estudios que proporcionen un mayor conocimiento acerca de las poblaciones de *P. cinnamomi* presentes en los cultivos de aguacate antioqueños, de manera que se pueda contar con referentes en la búsqueda o desarrollo de patrones de aguacate resistentes al microorganismo y en el diseño de otras estrategias de control.

Para el análisis fenotípico realizado en este estudio, los aislamientos de *P. cinnamomi* colectados de raíces de árboles de aguacate de Antioquia fueron llevados al laboratorio y evaluados según la morfología, el tamaño (diámetro) y la tasa de crecimiento de las colonias en un periodo de tiempo; teniendo en cuenta los estudios realizados en esta especie por Hüberli y colaboradores (2001), Eggers y su equipo de trabajo (2012), entre otros. Mientras que, para el estudio genético, se analizaron marcadores nucleares y mitocondriales, a través de la secuenciación directa de la región ITS del ADNr (Schreier, 2013) y la amplificación y digestión enzimática de las regiones intergénicas *trnG-rns* y *rns-nad3* del ADNmt (Martin & Coffey, 2012). Estos marcadores fueron seleccionados debido a que han demostrado ser altamente polimórficos, robustos y útiles en el diagnóstico rápido y confiable de agentes causales de enfermedades, en el análisis de las dinámicas poblacionales del fitopatógeno a nivel molecular (Macías et al. 2006; Martin & Coffey, 2012) y de otros aspectos del microorganismo, importantes para el diseño de esquemas de mejoramiento efectivos y duraderos.

## 2. Justificación

A nivel mundial, el cultivo de aguacate ha mostrado un notable crecimiento en los últimos años. Con base en datos de la FAO, se pudo establecer que entre 2010 y 2013, la producción de aguacate presentó un incremento promedio de cerca del 6% anual (FAOSTAT, 2017). En la actualidad, el aguacate es una de las frutas de mayor crecimiento en el mercado global, y cuenta con grandes perspectivas de crecimiento sostenido en las exportaciones futuras, considerando la campaña de promoción iniciada en los Estados Unidos para aumentar su consumo, y el incremento evidente de la demanda en el mercado europeo y la reciente apertura de otros como Japón y Rusia (Mincit, 2016).

México es el país con la mayor producción de aguacate en el mundo, en el 2014 aportó el 30.24% de la producción mundial total, seguido por República Dominicana y Perú, con un aporte de 8.52% y 6.95%, respectivamente; en este año la cuarta posición la ocupó Indonesia con 6.11% de la producción y Colombia fue el quinto con 5.74% (FAOSTAT, 2017). Sin embargo, en nuestro país, y posiblemente en la mayoría de las zonas productoras, gran parte del aguacate cosechado se destina a satisfacer la demanda interna del producto. Esto explica que la dinámica del comercio internacional de la fruta esté representada únicamente por cuatro países (México, Chile, España e Israel); no obstante, en los últimos años la exportación de aguacate a nivel mundial ha crecido cerca del 6%, comercializándose más del 20% del aguacate total producido, donde México, principal exportador, obtuvo ganancias superiores a los 1.500 millones de dólares. En Colombia, la exportación de aguacate también ha demostrado un crecimiento notable, especialmente en los departamentos del Tolima y Antioquia, ubicando al aguacate como la segunda fruta más exportada en el país, después del banano, representando ventas por más de USD 75 millones (Torres, 2009; Agro Progreso 2015, Mincit, 2016).

La nueva orientación de la producción de aguacate hacia la exportación, ha estado limitada por el reciente proceso de apertura de mercados y la competencia entre países exportadores; así mismo, las restricciones fitosanitarias han jugado un papel importante sobre la capacidad de los países productores de aguacate para movilizar sus productos en el exterior. Lo anterior se debe a que el aguacate se encuentra expuesto a numerosas plagas y enfermedades que pueden poner en riesgo los cultivos y, en general, la biodiversidad de los países en los que ingresa la fruta, entre estos se encuentran: *Xyleborus glabratus* (insecto vector de *Raffaelea lauricola* y *Fusarium* sp), *Sphaceloma perseae* (roña), *Heliothrips haemorrhoidalis* y *Scirtothrips* spp. (fruto con laceraciones), *Paratetranychus yothersi* (daño en el follaje por araña roja), *Colletotrichum* sp. (antracnosis),

*Conotrachelus aguacatae* y *C. perseae* (caída de frutos) *P. cinnamomi* (pudrición de raíz), entre otros (Schaffer et al. 2013).

La crítica situación que atraviesa Australia con relación a la presencia de *P. cinnamomi*, es un claro ejemplo de lo anteriormente descrito. Se cree que el fitopatógeno ingresó a este país en 1935 en plantas comerciales, desde entonces, se ha diseminado en varias regiones de Australia y hoy constituye una amenaza para más del 54% de las plantas nativas de este país, e incluso se ha demostrado un notable impacto sobre la fauna más pequeña del mismo (OEPP/EPPO, 2004). Tales son las dimensiones de la problemática ocasionada por *P. cinnamomi*, que ha sido formalmente reconocido en la legislación, tanto estatal como federal, y ha obligado al Gobierno Nacional a desarrollar en el 2009 el “*Threat Abatement Plan for Dieback Caused by the Root-Rot Fungus Phytophthora cinnamomi*”, una iniciativa que pretende minimizar el impacto del fitopatógeno (Zentmyer, 1977; Gobierno Australiano, 2009). A nivel global, *P. cinnamomi* se encuentra en la lista de las cien especies exóticas invasoras del “*Global Invasive Species Database*” (<http://www.issg.org>), es el único oomicete de la lista, y uno de los tres patógenos vegetales (Burgess et al. 2016).

En el resto del mundo, las pérdidas más significativas causadas por *P. cinnamomi*, se presentan en cultivos alimentarios, causando pudrición de raíces, especialmente en aguacate, esto sobretodo en California y el Sur de África. Este fitopatógeno provocó la mayor pérdida en la historia de la industria aguacatera en California (EE. UU.) en la década de los 70s, con una reducción severa en la producción de un 40%. En California, se estima que *P. cinnamomi* afecta entre el 60% y el 75% de los cultivos y ocasiona pérdidas anuales entre 30 y 40 millones de dólares (Coffey, 1992, Pagliaccia et al. 2013). En México, el principal productor de aguacate a nivel mundial, el oomicete ha sido detectado en las regiones productoras de Michoacán, Puebla, Chiapas, Veracruz, Nayarit y Morelos (Ochoa et al. 2009). En Michoacán en el año 1979 se habían registrado 13 mil árboles enfermos, y para 1994, se reportó que unos 100 mil árboles estaban afectados por la enfermedad en los principales siete municipios productores, lo que significó un costo económico de 640 millones de pesos para los productores ese año (Acosta, 2008).

Colombia, por su parte, ocupa el quinto lugar en la producción de aguacate a nivel mundial, con una participación de 5.74%, equivalente a 288739 t/año (FAO, 2017). En los últimos años, la producción promedio de frutos de aguacate en departamentos como el Cesar, uno de los principales productores

a nivel nacional, ha disminuido en un 23%, debido a factores limitantes del sistema productivo tanto de tipo biótico como abiótico; entre los factores bióticos destaca *P. cinnamomi*. Se estima que en nuestro país, el microorganismo ocasiona pérdidas que oscilan entre el 30 y 50% de plantas en vivero y en establecimiento temprano, respectivamente (Tamayo, 2007; Tofiño, Cabal & Gil, 2012; Ramírez et al. 2014); y ha sido identificado en los departamentos de Antioquia, Bolívar, Caldas, Cesar, Quindío, Tolima, Valle del Cauca, entre otros (Rodríguez et al. 2009). La amplia distribución que ha alcanzado *P. cinnamomi* en nuestro país y en el mundo, puede deberse a variaciones fenotípicas y genéticas en el fitopatógeno que le permiten una mayor adaptación a las diferentes condiciones donde se desarrolla el cultivo; dichas variaciones pueden tener también implicaciones importantes sobre su patogenicidad y, en consecuencia, sobre su manejo (Martínez, 2002)

Las estrategias de control de *P. cinnamomi* han estado basadas fundamentalmente en el uso de agroquímicos, entre los que se destaca el Metalaxyl, específico para oomicetes, y los fosfitos (Dobrowolski et al. 2008; Akinsanmi & Drenth, 2013); en prácticas culturales, como la solarización del suelo afectado y la implementación de zanjas que facilitan su drenaje (Gallo & Siverio, 1995); en menor medida, se han comenzado a realizar aplicaciones de agentes biocontroladores como el hongo *Trichoderma* spp, de efectividad conocida sobre otros fitopatógenos, y algunas bacterias antagonicas (Aryantha & Guest, 2006; Lara et al. 2011).

De igual manera, se ha encontrado en el uso de especies vegetales mejoradas una opción efectiva para hacer frente a la variabilidad en la respuesta a los métodos de control empleados contra diferentes fitopatógenos. Así también se ha considerado para los cultivos de aguacate, donde el uso de portainjertos tolerantes se ha propuesto desde 1957 (Zentmyer, 1957), llegándose a avances significativos como el descubrimiento del cultivar “*Duke*” (Zentmyer, Thorn & Burns, 1963) altamente tolerante a la enfermedad y compatible con el injerto comercial (Douhan et al. 2011). No obstante, ha sido difícil adaptar este y otros portainjertos resistentes a todas las áreas del mundo en las que se cultiva aguacate, por lo que se ha planteado la necesidad de seleccionar variedades tolerantes o resistentes nativas de cada país. Esta ha sido una tarea difícil de realizar en Colombia, puesto que las semillas utilizadas para producir los patrones o portainjertos son de origen desconocido, en la mayoría de los casos, susceptibles a pudriciones radiculares (Rodríguez et al. 2009; Ramírez, Castañeda & Morales, 2016)

El conocimiento de la diversidad morfológica y genética dentro de una especie fitopatógena ha sido propuesto como un prerrequisito para el desarrollo de estrategias de manejo efectivas (Ochoa et al.

2009; Mbaka et al. 2010), no solo para la selección de variedades de portainjertos resistentes o tolerantes sino también para la identificación de diferencias en la patogenicidad y para prevenir la pérdida de sensibilidad a los fungicidas y a otros mecanismos de control, lo cual depende de su potencial evolutivo (Tommerup, Dobrowolski & Shearer, 1999; Schreier, 2013). De igual manera, conocer la diversidad genética y fenotípica de *P. cinnamomi* puede dar nociones sobre el punto y forma de ingreso del fitopatógeno al departamento, o incluso al país, permitiría predecir su distribución en diferentes zonas productoras o en especies vegetales susceptibles y determinar cuál es su potencial genético para su adaptación en diferentes hábitats (Linde et al. 1997; Linde, Drenth & Wingfield, 1999a).

Adicionalmente, se sabe que *P. cinnamomi* es un microorganismo heterotálico que presenta los tipos de apareamiento A1 y A2; sin embargo, en todo el mundo se ha evidenciado dominancia de la reproducción asexual o clonal (Linde et al. 1999a; Pagliaccia et al. 2013) y, en muchos casos, se desconoce el papel de la reproducción sexual en la epidemiología de las enfermedades causadas por el fitopatógeno (Pagliaccia et al. 2013). Incluso se cree que el grupo A2 presenta mayor grado de agresividad, y es el más común en cultivos agrícolas (Ochoa et al. 2009). La variación fenotípica, como son las diferencias en la patogenicidad o diferencias en el comportamiento según las condiciones climáticas o fisicoquímicas del hábitat, puede indicar la posibilidad de cambios genéticos (Dobrowolski, 1999).

El estudio de las poblaciones de *P. cinnamomi* alrededor del mundo, ha sido abordado bajo diferentes aproximaciones a nivel fenotípico (Mbaka et al. 2010), patogénico (Dudzinski, Old & Gibbs, 1993), genotípico (Linde et al. 1999a) o con la integración de todos los factores que interactúan en una población (Eggers, Balci & MacDonald, 2012). Las investigaciones más recientemente publicadas incluyeron análisis fenotípicos (Mbaka et al. 2010) y genéticos por isoenzimas y polimorfismos en el ADN nuclear con RAPD (Polimorfismos de ADN amplificados al azar) y RFLP (Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción) para caracterizar las poblaciones africanas (Linde et al. 1997; Linde et al. 1999a), los RAPD junto con los AFLP (Polimorfismos de la longitud de los fragmentos amplificados) y los microsátélites también han sido usados en estudios realizados en América, especialmente en México y Estados Unidos (Ochoa et al. 2009; Eggers et al. 2012; Pagliaccia et al. 2013); de igual manera se han usado los AFLP sobre poblaciones de *P. cinnamomi* de España y Portugal. Sin embargo, estas técnicas revelaron variación fenotípica independiente y

continua, y baja diversidad genotípica y heterocigosidad, indicando que la población no se recombina sexualmente (Martin & Coffey, 2012).

La literatura refiere que cuando se trabaja con poblaciones predominantemente clonales, el genoma mitocondrial puede proporcionar un marcador adicional para el estudio de polimorfismos inter e intraespecíficos, debido a que es heredado uniparentalmente (García, Gutiérrez & Marín, 2013). De hecho, varios *loci* mitocondriales han sido usados para estudios filogenéticos dentro del género *Phytophthora* (Martin & Tooley, 2004; Kroon et al. 2012; Martin & Coffey, 2012); no obstante, el marcador ha demostrado ser útil en la delimitación de especies, pero es poco informativo para estudios dentro de las mismas (Schreier, 2013). En el año 2012, Martin y Coffey, analizaron varias regiones intra e inter génicas del ADN mitocondrial de aislamientos de *P. cinnamomi*, entre las cuales, pudieron identificar tres *loci* con potencial para diferenciar los haplotipos de la población en estudio: *trnG-rns*, *rns-nad3* y *nad9* o *secY*.

Hasta el momento, en Colombia no existen estudios sobre la diferenciación genética de este importante fitopatógeno y no se conoce si su población es predominantemente clonal sin reproducción sexual, aunque es de esperarse que lo fuera ya que aparentemente solo está presente el tipo de apareamiento A2, debido a que es el tipo de apareamiento más común en el mundo, mientras que poblaciones con apareamiento de tipo A1 solo se han encontrado en Papua Nueva Guinea, considerado el centro de origen de la especie, y en Australia y Sur África, donde se cree que el fitopatógeno fue introducido por tráfico de material vegetal entre países (Linde et al. 1999a).

Dado lo anterior, las proyecciones que se tienen para el cultivo comercial de aguacate precisan un mayor entendimiento de la estructura poblacional de *P. cinnamomi*. De acuerdo con esto, en este trabajo se realizó una caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de árboles de aguacate de regiones productoras del departamento de Antioquia, Colombia. La caracterización morfológica se hizo a través de la descripción de la forma de las colonias de los aislamientos, sus tamaños y tasas de crecimiento; mientras que la caracterización molecular se realizó por secuenciación directa de la región ITS del ADNr (Schreier, 2013) y la amplificación y digestión con enzimas de restricción de las regiones intergénicas *trnG-rns* y *rns-nad3* del ADNmt (Martin & Coffey, 2012).

### 3. Marco teórico y revisión de literatura

#### A GENERALIDADES DEL AGUACATE

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un miembro de la familia Lauracea, una familia principalmente subtropical o tropical incluida en el orden Laurales, en el primer clado de angiospermas divergentes de las Magnoliáceas. El aguacate es altamente variable, dado que su producción se ha basado en cruces entre poblaciones de diferentes cultivos, lo cual ha conllevado a la producción y caracterización de tres razas, la mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*), la guatemalteca (*P. americana* var. *guatemalensis*) y la antillana (*P. americana* var. *americana*) (Alcaraz & Hormaza, 2011; Martínez et al. 2011). En su hábitat natural, el aguacate crece hasta 10-12 m, presenta raíces laterales, hojas simples, enteras, lisas, coriáceas y de color verde oscuro. Las flores son hermafroditas, simétricas y verde amarillas; el fruto no madura en el árbol, tiene forma ovalada, globular o elíptica, con variación en el color desde verde, púrpura oscuro a negro, la forma, color, estructura y consistencia del fruto, son características especiales de cada variedad (Martínez et al. 2011).

Se estima que *P. americana* Mill. es nativo de las tierras altas del centro y el este de México y de Centro América (Martínez et al. 2011); desde donde se ha extendido a nivel mundial siendo ampliamente valorado, no solo por su sabor único y agradable textura cremosa y suave, sino también por sus beneficios sobre la salud. El tejido del mesocarpo posee inherentemente altas concentraciones de ácidos grasos insaturados y carbohidratos de siete carbonos. Investigaciones han demostrado que una dieta rica en aguacate puede contribuir a disminuir los niveles de colesterol (Landahl, Meyer & Terry, 2009). Los aguacates también contienen una variedad de vitaminas, minerales y fitoquímicos como la luteína, antioxidantes fenólicos, y fitoesteroles asociados con numerosos beneficios potenciales para la salud (Fulgoni, Dreher & Davenport, 2013).

La producción mundial de aguacate actual sobrepasa las 3.5 millones de toneladas, de las cuales se comercializa el 20%. Pese a que sigue siendo considerada una fruta de segundo nivel en comparación con las uvas, los cítricos, los bananos y las manzanas, su consumo mundial aumenta rápidamente, en especial en Estados Unidos, que en 10 años elevó sus importaciones de aguacate en un 80%, en Europa, cuyas importaciones alcanzaron las 274000 t entre 2009 y 2012 y en Asia, donde el aguacate todavía se encuentra en una etapa relativamente temprana de comercialización. Alrededor del 80% de los aguacates que se consumen en todo el mundo son de la variedad Hass, siendo México y Chile los principales abastecedores (Schaffer et al. 2013).

En la actualidad, Colombia ocupa el quinto puesto entre los principales países productores de aguacate con 288739 t/año (FAO, 2017). Tolima se ha posicionado como el principal departamento aguacatero con el 22.84% de la producción, seguido de Antioquia y Caldas con el 16.56% y el 14.96%, respectivamente (AGRONET, 2017). La apuesta exportadora que hay por este producto, supone crecimientos y una mayor participación en el mercado (Mincit, 2016).

No obstante, la producción nacional e internacional de aguacate todavía debe superar desafíos como su bajo rendimiento promedio (8-12 ton/ha) frente a su potencial estimado de 30 ton/ha, la rotación de cultivares, los portainjertos, la tecnología y las enfermedades, principalmente la pudrición radicular causada por *P. cinnamomi* y otras emergentes causadas por virus, hongos y bacterias, o los problemas generados por las plagas; para las cuales se están haciendo progresos en portainjertos clonales tolerantes, pero se requieren portainjertos clonales verdaderamente resistentes (Schaffer et al. 2013).

## **B GENERALIDADES DE *Phytophthora cinnamomi***

### **i) TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN (Acosta, 2008; *Catalogue of life*, 2017)**

REINO: Chromista (Stramenopila)

PHYLLUM: Oomycota

CLASE: Peronosporae

ORDEN: Peronosporales

FAMILIA: Peronosporaceae

GÉNERO: *Phytophthora*

ESPECIE: *Phytophthora cinnamomi*

En el pasado, los oomicetes, grupo de microorganismos en el cual está ubicado el género *Phytophthora*, fueron incluidos en el reino de los hongos por sus hábitos de crecimiento micelial, la formación de esporas para su reproducción asexual y por el modo de adquirir los nutrientes; sin embargo, nunca se desconocieron sus notables diferencias bioquímicas y estructurales con los mismos, al punto de ser denominados vulgarmente como hongos inferiores (Castañeda, 2009), dada

la ausencia de septos en las hifas, resultante en una condición multinucleada (llamada cenocítica), la pared celular compuesta de  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,6 glucano y no de quitina (el polímero de N-acetil glucosamina, que se encuentra en las paredes de los hongos verdaderos) y la producción de zoosporas carentes de pared celular con un aparato biflagelar heterocóntico (morfológica y funcionalmente diferentes), en muchos de ellos; estas características y los análisis bioquímicos y filogenéticos realizados en los últimos años, han suscitado copiosas discusiones en torno a la clasificación taxonómica de los oomicetes (Erwin & Ribeiro, 1996; Raven, Evert & Eichhorn, 1999), las cuales terminaron por agruparlos, junto a las algas *chrysophytas*, diatomeas y algas pardas, al igual que otras taxas con mastigonemas, en un ensamble denominado Stramenopila (Jaramillo, 2003; Castañeda, 2009; O'Brien & Hardy, 2014).

## ii) ANTECEDENTES HISTÓRICOS DEL ORIGEN Y MIGRACIONES DEL FITOPATÓGENO

El nombre científico, *Phytophthora*, es una palabra derivada del griego que significa “destructor de plantas”. Dentro de este género, la especie *P. cinnamomi* es la más dispersa y la de mayor número de hospederos. El primer reporte de la especie se acredita a Rands, quien, en 1922, la aisló de canchros en árboles de canela (*Cinnamomum burmannii* Blume), en Sumatra y desde entonces, contrario a lo que se observa en la mayoría de los patógenos que, generalmente, son selectivos hacia sus hospederos, *P. cinnamomi* ha sido conocido por infectar una amplia variedad de plantas en muchos países del mundo, encontrándose, actualmente, en más de 3000 hospederos, unos 2000 de ellos tan solo en Australia, donde afecta miles de hectáreas de plantas leñosas, árboles o arbustos, ornamentales, cultivados y silvestres; pero siendo citado en más de 75 países (Newell, 1994). En Australia, uno de los más afectados por *P. cinnamomi*, el microorganismo fue detectado por primera vez en 1935, aunque la evidencia histórica de los impactos de la agricultura en el siglo XIX, ha mostrado que el fitopatógeno pudo ser introducido allí por los primeros colonos europeos, probablemente con el comercio de plantas. La primera publicación sobre la pudrición de raíces ocasionada por *P. cinnamomi* la hizo Tucker en 1927 en Puerto Rico, aunque se cree que entró a Latinoamérica en el siglo XVIII, pero fue hasta 1942 cuando en California (EE. UU.), Payer lo aisló de plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.) enfermas por el daño del fitopatógeno en la raíz, confirmando que *P. cinnamomi* es el agente causal de la enfermedad; también se estableció que el agua es un factor importante en la formación, dispersión y germinación de sus zoosporas (Acosta, 2008; *Department of sustainability and environment*, 2008; Castañeda, 2009).

### iii) CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

El comportamiento de *P. cinnamomi* se debe en gran medida a las estructuras especializadas que posee, las cuales le confieren capacidad de dispersión en el ambiente y resistencia a condiciones adversas. El fitopatógeno hiberna en forma de oosporas, clamidosporas o micelio en el suelo o en las raíces que ha infectado. Una vez las condiciones son favorables, las oosporas y las clamidosporas germinan, mientras que el micelio prosigue su desarrollo y/o produce zoosporangios que liberan zoosporas. Estas últimas nadan en el agua del suelo entorno a las raíces y las infectan si las plantas son susceptibles, al entrar en contacto con la punta de la raíz por medio de una prolongación hifal que penetra la superficie de las mismas. El oomicete forma más micelio y zoosporas en climas húmedos y moderadamente fríos y disemina la enfermedad a otras plantas a través del contacto raíz-raíz. En climas secos, cálidos e incluso demasiado fríos, sobrevive en forma de oosporas, clamidosporas o micelio, con las cuales pueden iniciar nuevamente infecciones cuando las condiciones de humedad y temperatura se tornan favorables nuevamente (Acosta, 2008; Collins et al. 2012). Las características de las principales estructuras son las siguientes:

#### (a) MICELIO

El micelio de *P. cinnamomi*, como estructura somática compuesta por hifas, es cenocítico (sin septos), toruloso, hialino, ramificado, con nódulos redondos, característicos de la especie. Prolifera dentro de la raíz, alimentándose de los azúcares y destruyendo los tejidos vegetales hasta la pudrición. El diámetro del micelio es variable, oscilando entre 5 – 8  $\mu\text{m}$  de ancho, posee dilataciones hifales esféricas con racimos de 42 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, que le dan un aspecto botrioso a coraliforme. Se mantiene viable entre 1 a 60 días.

El crecimiento micelial en medios de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar), presenta un aspecto algodonoso, en forma de camelia (Castañeda, 2009).

#### (b) ZOOSPORANGIOS

Estructura de la reproducción asexual que puede germinar por elongación hifal directa o por fraccionamiento del citoplasma en compartimentos uninucleados que son liberados al ambiente como zoosporas por disolución del material de la pared del ápice. Pueden ser ovoides, ovopiriformes o elipsoides, con un ápice no papilado (engrosamiento apical sobre el esporangio) compacto, no caducos, su base es redonda y estrecha, sujeta por una zona terminal. El tamaño promedio es de 43.6-

75  $\mu\text{m}$  de largo y 25.9 - 47  $\mu\text{m}$  de ancho, aunque tanto la forma como el tamaño varían con las condiciones ambientales y nutricionales. Pueden mantenerse viables por 3-42 días (Acosta, 2008; Castañeda, 2009; Schreier, 2013).

#### (c) ZOOSPORAS

Las zoosporas son la clave de la diseminación y el establecimiento de la enfermedad, dado que son los principales propágulos infectivos del fitopatógeno, provienen de los zoosporangios, son de vida corta, frágiles y producidas en gran número; poseen movilidad a través de un flagelo anterior que le sirve para desplazarse con un movimiento sinusoidal y otro posterior liso que funciona como timón, son atraídas a los sitios de infección de las raíces por quimiotaxis desde una distancia de 3-4 mm y atacan la superficie más externa de las puntas de la raíz, ya que poseen una marcada habilidad para sintetizar una pared celular enquistada en pocos minutos, de la cual surge una elongación hifal. La pared celular luce intacta durante el proceso de infección, a excepción del punto de entrada del tubo germinativo, donde una pequeña lesión se hace evidente (Newell, 1994; Acosta, 2008).

#### (d) CLAMIDOSPORAS

Son estructuras de supervivencia que se forman abundantemente en cultivos y tejidos infectados bajo condiciones de crecimiento desfavorables, con un tiempo de vida medio de 84-365 días. Las clamidosporas de *P. cinnamomi* tienen diámetros promedio de 40 a 135  $\mu\text{m}$ , son de pared delgada (0.5  $\mu\text{m}$ ), globosas y muchas son de forma irregular, pueden presentar grupos de dos a tres por hifa de forma terminal, con apariencia similar a un racimo de uvas, o intercaladas en el micelio (Acosta, 2008; Castañeda, 2009).

#### (e) ÓRGANOS SEXUALES

Esta especie es heterotálica, las oosporas se forman cuando los tipos de apareamiento A1 y A2 se unen, aunque es poco común encontrar los dos tipos en un mismo lugar. Los anteridios (órganos masculinos) son anfígenos (ubicado debajo del oogonio) y promedian un tamaño de 19 x 17  $\mu\text{m}$ . Los oogonios (órganos femeninos) son redondos y, a menudo, con una base estrecha, de pared lisa y hialina, cuyo diámetro promedia los 40  $\mu\text{m}$ . Durante la fertilización, un tubo del anteridio penetra el oogonio, las oosporas resultantes son redondas, de color hialino a café-amarillo, pleróticas (una sola ocupa todo el espacio disponible dentro del oogonio) y su diámetro promedio depende del medio de cultivo, aunque el rango es de 20-40  $\mu\text{m}$ . Permanecen viables más de 365 días (Acosta, 2008).

#### iv) **BIOLOGÍA Y CICLO DE LA ENFERMEDAD**

Las zoosporas, cuando alcanzan la raíz del hospedero, se adhieren a las raicillas formando una pared celular, se enquistan y germinan sobre ellas. El proceso de enquistamiento implica la pérdida de motilidad a través de la pérdida de los dos flagelos, incluyendo la secreción de un material adhesivo con el cual se adhieren las zoosporas a la superficie de la raíz y, al cabo de cinco minutos, se forma la pared celular celulósica.

La germinación de los quistes ocurre de 20 a 30 minutos después del enquistamiento. Los tubos germinativos pueden seguir creciendo por una hora, aproximadamente, en ausencia de nutrientes exógenos. En la cercanía de una raíz, crecen quimiotrópicamente hacia la misma, penetrando la superficie entre las células epidérmicas. La penetración ocurre dentro de 24 horas después de la infección. Cerca de seis horas después de la penetración, el tejido de la raíz alimentadora está muerto y el microorganismo crece dentro de este tejido necrótico por unos días más. Cuando las reservas alimenticias del tejido de la raíz se agotan, el fitopatógeno es estimulado a esporular, se forman dos tipos de esporas: zoosporas y clamidosporas. Dos a tres días después de la infección, el fitopatógeno puede esporular otra vez, formando zoosporangios sobre la superficie de la raíz y liberando más zoosporas en el medio que la rodea. De esta manera el inóculo se multiplica rápidamente.

Esta especie de *Phytophthora* tiene mayor capacidad para sobrevivir como saprófito que otras especies y puede permanecer hasta seis años en suelos naturalmente infestados a 20°C y 20% de humedad (McCarren, 2006). En suelos cultivados con aguacate, el fitopatógeno puede ser recuperado al cabo de un periodo de diez años. El fitopatógeno puede sobrevivir en suelos húmedos por muchos años, ya sea en raíces alimenticias muertas (las que son muy persistentes en el suelo), como micelio inactivo, clamidosporas u oosporas. Las oosporas se forman en presencia de raíces del aguacate, pero no se encuentran en tejidos naturalmente infectados. El agua libre no es esencial para la producción de clamidosporas y oosporas de *P. cinnamomi*, estas estructuras pueden ser producidas en medio líquido (Acosta, 2008)

#### v) **FACTORES DEL AMBIENTE QUE INCIDEN EN LA DISTRIBUCIÓN DE *P. cinnamomi*.**

Como con cualquier otro organismo, la distribución de *P. cinnamomi* depende de las limitaciones ambientales, dentro de los factores con mayor influencia están incluidos la temperatura, el tipo de suelo, el agua y el estado de los nutrientes.

**(a) TEMPERATURA**

*P. cinnamomi* se desarrolla mejor en áreas de climas templados benignos o subtropicales, entre los 21°C y los 31°C se presenta un crecimiento micelial y una producción esporangial óptimos, por fuera de este rango, es probable que la producción de zoosporas y zoosporangios se vea inhibida. La inactivación térmica de *P. cinnamomi in vitro* ocurre a 0°C; sin embargo, la tasa de inactivación a bajas temperaturas bajo condiciones naturales está relacionada con el tipo de suelo en el cual se encuentra el microorganismo, no se desarrolla o su supervivencia se ve afectada con temperaturas del suelo por debajo de 5-6°C, o a temperaturas por encima de 34-36°C; además, la capacidad infectiva de *P. cinnamomi* disminuye por debajo de los 15°C (Acosta, 2008).

**(b) AGUA**

La baja disponibilidad de agua combinada con altas temperaturas, también restringe el crecimiento de *P. cinnamomi* y, probablemente, limita la distribución del hongo a las regiones templadas húmedas, condiciones que promueven la producción de zoosporangios, las zoosporas son distribuidas libremente y diseminadas a través del agua de escorrentía, favoreciendo la invasión de raíces hospederas; sin embargo, la producción de zoosporangios disminuye rápidamente con un descenso en el potencial de agua del suelo. En este sentido, el tipo de suelo juega un papel importante en la expresión de la enfermedad.

Pese a los periodos de sequía, se ha observado que las clamidosporas pueden sobrevivir entre varios meses y hasta seis años en suelo en condiciones de agua por debajo de las óptimas (Acosta, 2008).

**(c) pH**

La enfermedad se produce con mayor rapidez bajo condiciones de suelo con pH ligeramente ácido a neutro (Acosta, 2008)

**(d) TIPO DE SUELO Y NUTRIENTES**

Los suelos arcillosos, por su naturaleza, pueden alternar entre estar extremadamente húmedos o extremadamente secos con solo pequeñas fluctuaciones en el contenido de agua. Consecuentemente, en estos suelos pueden encontrarse grandes variaciones en los niveles poblacionales de *P. cinnamomi* con alteraciones leves en la cantidad de agua presente. En suelos boscosos cubiertos, *P. cinnamomi* sobrevive pobremente dado que las temperaturas del suelo se retardan por las fluctuaciones diurnas

y pueden mantenerse por debajo de las temperaturas críticas para el crecimiento. De esta manera, tanto la cubierta de copa como los niveles de hojarasca, pueden jugar un papel en la expresión de la enfermedad al mantener baja la temperatura del suelo, especialmente en condiciones húmedas en otoño, invierno y primavera (Acosta, 2008).

#### **vi) CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD Y DAÑOS CAUSADOS**

La pudrición de raíces de aguacate se presenta desde la etapa de vivero en los almácigos, las plántulas afectadas en esta etapa pueden llegar a morir prematuramente antes de que se produzca el prendimiento del injerto, debido a la necrosis del cuello del patrón. En otras ocasiones, las plántulas exhiben escaso crecimiento, reducido desarrollo foliar y amarillamiento generalizado de las hojas. A medida que la infección progresa, se presenta la necrosis de la parte basal del tallo del patrón. Las plántulas se marchitan, pierden las hojas y se inicia la muerte ascendente del patrón y descendente de la copa. Al examinar las raíces secundarias, estas presentan necrosis parcial (Tamayo, 2007; Castañeda, 2009).

En condiciones de campo, la enfermedad se presenta en focos, en las zonas más húmedas. Los árboles afectados detienen su crecimiento, las hojas son más pequeñas, de color verde pálido en lugar verde oscuro y tienden a caer, también pueden lucir marchitas y, frecuentemente, tienen sus puntas de color café. Con el transcurrir del tiempo, el follaje se hace escaso, se presenta un amarillamiento leve pero generalizado del árbol, acompañado o no de rebrotes y floraciones excesivas a destiempo. En fases avanzadas de la enfermedad, las ramas van muriendo de la punta a la base (muerte regresiva), provocando que otras ramas queden descubiertas y sufran quemaduras de sol (Acosta, 2008). Cuando hay frutos, estos no alcanzan su tamaño normal y es común observar que se producen en mayor número. A medida que el vigor del árbol es menor, se observa marchitez leve pero progresiva del árbol, aún en condiciones de adecuada humedad, debido a la pudrición de las raíces absorbentes, disminuyendo la toma de agua y nutrientes. Después, las ramas laterales muestran un secamiento descendente, luego se presenta el secamiento generalizado de las hojas, que permanecen adheridas al árbol por algún tiempo, con posterior caída gradual de las mismas, hasta que finalmente, el árbol sufre un paloteo generalizado y se seca (Tamayo, 2007).

Los síntomas típicos en el sistema radicular son: pudrición de las raíces alimentadoras, las cuales se tornan negras y quebradizas; las raíces largas y gruesas son menos dañadas y tienen la capacidad de producir nuevas raicillas que prolongan la vida del árbol durante algún tiempo (Castañeda, 2009). El

microorganismo puede atacar la base del tallo y colonizarlo totalmente, produciendo marchitez, secamiento y muerte repentina del árbol. En otras ocasiones se observan lesiones o chancros de color café en la base del tallo, en la unión del patrón y la copa, presumiblemente causados por otras especies de *Phytophthora*, en cuyo caso, se presenta amarillamiento parcial, secamiento, paloteo y caída de hojas en una parte del árbol. Se ha encontrado resistencia moderada o tolerancia a *P. cinnamomi* en las variedades de aguacate *Duke 7* y *Thomas*; sin embargo, estos patrones no se utilizan comercialmente en Colombia por su baja productividad (Tamayo, 2007; Ramírez et al. 2016).

Actualmente se conocen los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2 de este fitopatógeno (Erwin & Ribeiro, 1996; Alexopolus, 1996); los cuales permiten el desarrollo de la fase sexual del oomicete, convirtiéndose en una fuente potencial de variabilidad intraespecífica en especies heterotálicas (Boccas & Zentmyer, 1976). EL grupo A2 presenta mayor grado de agresividad y es el más común en cultivos agrícolas (Ochoa et al. 2009). Un análisis de isoenzimas realizado en poblaciones de *P. cinnamomi* indicó que ambos grupos de compatibilidad sexual solo están presentes en Australia (Old, Moran & Bell, 1984) y Sur África (Linde et al. 1997).

En el desarrollo de síntomas de la enfermedad, contribuyen diferentes factores bióticos y abióticos como el genotipo del árbol, las condiciones físicas y químicas del suelo, así como el clima de la región, presentándose con mayor severidad en condiciones húmedas tropicales y subtropicales, en suelos mal drenados y arcillosos (Schaffer et al. 2013).

#### **vii) DETECCIÓN DE *P. cinnamomi* EN CULTIVOS DE AGUACATE**

Es posible que la ubicación de los oomicetes dentro del reino de los hongos, durante tantos años, haya retrasado el proceso del conocimiento de la biología y el diseño de productos más apropiados para el control de especies fitopatógenas tales como *P. cinnamomi* (Jaramillo, 2003; O'Brien & Hardy, 2014). No obstante, la amenaza que este microorganismo representa para la flora nativa y los cultivos comerciales de muchos países en los que ha sido encontrado, ha conducido a numerosas investigaciones sobre su biología, comportamiento, hospederos, efectos en el ambiente, entre otros factores; con el empleo de metodologías de aislamiento e identificación, entre las que se incluyen las siguientes:

**(a) CULTIVO EN PLACA, TRAMPEO O COMBINACIÓN DE AMBAS**

Son los métodos estándares de detección por propágulos viables de especies de *Phytophthora*, los cuales permiten la apreciación de otros microorganismos de importancia sanitaria presentes en las muestras y pueden ser semicuantitativos. Pueden hacerse a través de la siembra en medio selectivo de raíces o suelo presuntamente infectados y/o por trampeo con partes de plantas susceptibles a la enfermedad, tales como frutas u hojas (manzana, aguacate, rododendro) en muestras de suelo. Sin embargo, estas técnicas consumen gran cantidad de tiempo (al menos 15 días) y son laboriosas, requieren experticia en el aislamiento y la diferenciación morfológica de especies de *Phytophthora*; lo cual conduce a continuos falsos negativos cuando se usan (Eden, Hill & Galpoththage, 2000; Kong et al. 2003; OEPP/EPPO, 2004).

**(b) PRUEBAS SEROLÓGICAS**

Varias pruebas serológicas han sido desarrolladas para la rápida detección de especies de *Phytophthora*. Estas pruebas emplean, ya sea Ensayos Inmunoabsorbentes Unidos a Enzima (ELISA), ensayos de captación por membrana o tirillas reactivas. Algunos de estos inmunoensayos están comercialmente disponibles para su uso *in situ* y algunos *kits* permiten a los productores obtener resultados 10 minutos después de la colección de muestra. Los problemas comunes asociados con las pruebas serológicas son la baja especificidad y la baja sensibilidad. De especial relevancia es la reacción cruzada de los *kits* de diagnóstico de *Phytophthora* con *Pythium* spp. Algunas especies de *Pythium* pueden estar en concentraciones mayores que las de *Phytophthora* en el ambiente y, muchas de esas especies son benéficas o no patógenas; en agua de irrigación, por ejemplo, se han encontrado especies de *Pythium* en un número 10-100 veces mayor que *Phytophthora*. La aplicación de estos *kits*, por lo tanto, puede resultar en falsos positivos para la detección de *Phytophthora*. Otra consideración es que la mayoría de *kits* diagnósticos no pueden diferenciar especies particulares del género *Phytophthora*, esto es problemático para los programas de monitoreo de los fitopatógenos en vivero, donde más de una docena de especies de *Phytophthora* pueden estar presentes, pero no todos son tan patogénicamente importantes como *P. cinnamomi* (Kong et al. 2003; OEPP/EPPO, 2004).

**(c) PRUEBAS MOLECULARES**

Los métodos moleculares tales como los análisis de isoenzimas pueden servir como evidencia confirmatoria para la identificación de *P. cinnamomi*, en tanto que el fitopatógeno es homogéneo y

distinguible en las proteínas totales y las isoenzimas. No obstante, por si solas, han demostrado inespecificidad sobre el microorganismo de interés (OEPP/EPPO, 2004).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha tomado más interés en la detección e identificación de *P. cinnamomi* debido a su velocidad y sensibilidad. Varios protocolos de PCR han sido reportados para *Phytophthora* spp. La mayoría de estos protocolos usan cebadores derivados de los Espaciadores Internos Transcritos (ITS) o de los genes de elicítina, dado que la secuencia de ADN de estas regiones o genes, pueden ser fácilmente detectadas gracias al alto número de copias en el genoma. Una gran cantidad de datos sobre el nivel de conservación intraespecífica de estas secuencias también ha facilitado el uso de dichas regiones o genes para detección especies (Salto, 2006).

La mayor parte de los estudios que se vienen realizando actualmente para el diagnóstico y/o evaluación de la variabilidad intraespecífica de *P. cinnamomi*, utilizan marcadores moleculares basados en el ADN como los RFLP (o Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción), AFLP (o Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados), RAPD (o Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), Microsatélites, entre otros, que resultan prometedores por su especificidad, sensibilidad y reproducibilidad, una vez se han estandarizado las condiciones de trabajo (Drenth et al. 2006; del Castillo et al. 2013).

#### **viii) DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *P. cinnamomi* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES**

El género *Phytophthora* está compuesto por 124 especies aproximadamente, las cuales son consideradas los patógenos de plantas más destructivos, por lo que constituyen una amenaza inmediata y real para la agricultura mundial (Cooke et al. 2000; Pandey, 2015). En un principio, las relaciones entre las especies del género estuvieron basadas en caracteres morfológicos como la caducidad del zoosporangio, la forma del anteridio o el comportamiento reproductivo (Blair et al. 2008). Fue así como Waterhouse clasificó las especies descritas hasta entonces en seis grupos morfológicos que por mucho tiempo sirvieron como referente para las claves taxonómicas; sin embargo, su aplicación estaba limitada por la complejidad para diferenciar características reproductivas y por la plasticidad de sus caracteres morfológicos y culturales (Cooke et al. 2000). La aparición de la biología molecular, trajo consigo nuevas herramientas para los estudios de genética poblacional del género, empleando principalmente la región ITS del ADN ribosomal

nuclear y los genes de citocromo oxidasa I y II del ADN mitocondrial. Los últimos estudios han estado basados en el uso de marcadores múltiples, que en la actualidad separan el género en diez clados que abarcan incluso las especies descubiertas más recientemente (Blair et al. 2008).

En el caso de la especie *P. cinnamomi*, los estudios de estructura poblacional también han sido abordados desde diferentes enfoques. Las aproximaciones basadas en análisis de las características fenotípicas son las más tradicionales e incluyen comparaciones en tamaños y formas de diferentes estructuras, preferencias a hospederos, resistencia a fungicidas, patrones de crecimiento y tipos de apareamiento (Lamour, 2013). Una de las investigaciones más recientes basada en estas características, se llevó a cabo en cultivos de macadamia en Kenia como pre-requisito para el desarrollo de estrategias efectivas de manejo, debido a que la variabilidad puede elevar la capacidad del fitopatógeno de sobrevivir a condiciones adversas o a superar o resistir las medidas de contención; además de las características morfológicas como tamaño de los zoosporangios y tasas de crecimiento, evaluaron la patogenicidad y la virulencia de los aislamientos obteniendo diferencias en morfología y comportamiento entre el tipo de apareamiento A1 y A2 que permitirían reconocerlos con un grado de certeza (Mbaka et al. 2010). No obstante, la plasticidad de estos caracteres en un mismo individuo, dificulta su uso como criterio único en estudios de diversidad fenotípica de *P. cinnamomi* (Lamour, 2013).

Análisis más detallados de la estructura poblacional de *P. cinnamomi* se han logrado con el uso de diferentes marcadores moleculares, entre los cuales caben resaltar los estudios con isoenzimas realizados por Linde y colaboradores (1997) sobre la población surafricana de *P. cinnamomi*, y en un segundo trabajo con RAPD y RFLP (Linde et al. 1999a), donde se incluyeron poblaciones australianas, evidenciando en ambas bajos niveles de diversidad genotípica y de genes, una reproducción principalmente clonal y similitudes tales que condujeron a la conclusión que dichas poblaciones fueron introducidas desde el mismo centro de origen, Papua Nueva Guinea. Dobrowolski (1999) retomó el estudio de las poblaciones australianas usando microsatélites con los que confirmó que el fitopatógeno fue introducido, además, encontró que su población en Australia está conformada por tres linajes clonales uno con el tipo de apareamiento A1 y los dos restantes con el tipo A2. Los microsatélites desarrollados por Dobrowolski (1999) fueron empleados también para estudiar las variaciones entre aislamientos de *P. cinnamomi* del Este de Estados Unidos, los cuales se complementaron con análisis fenotípicos y de patogenicidad que permitieron concluir que las características morfológicas evaluadas no eran un factor que sirviera para predecir el genotipo y que la variabilidad de la población de *P. cinnamomi* de esta área también es baja (Eggers et al. 2012); de

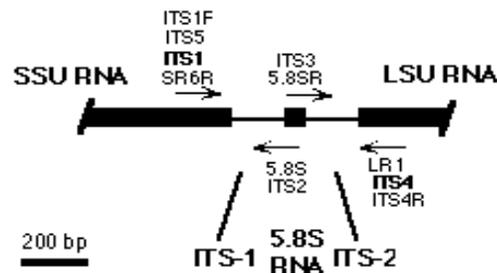
igual manera, Pagliaccia y colaboradores (2013) analizaron la estructura poblacional de *P. cinnamomi* asociada con aguacate en California, utilizando AFLPs, los cuales revelaron una estructura significativa, baja diversidad genotípica y un solo tipo de apareamiento (A2), consistente con reproducción asexual, así como la reciente introducción de un linaje no identificado en estudios previos realizados en esta región. Los AFLPs ya habían sido aplicados por Caetano y colaboradores (2009) en poblaciones del fitopatógeno en España y Portugal, pudiendo diferenciar dos grupos relacionados con el origen geográfico de los aislamientos que difieren, entre otras cosas, en su nivel de agresividad y poseen una similitud de solo el 20%. Aproximaciones comparables se han realizado en México con RAPDs (Ochoa et al. 2009), estos últimos también fueron usados en Taiwán y en otras regiones del mundo con hallazgos similares a los ya descritos en cuanto a la reproducción clonal, la baja variabilidad genética y el centro de origen del fitopatógeno.

Gran parte de estos trabajos y la mayoría de los desarrollados con marcadores moleculares sobre *P. cinnamomi*, hasta ahora han estado basados en el ADN nuclear; no obstante, las conclusiones derivadas justifican la búsqueda de otros marcadores en, por ejemplo, el ADN mitocondrial (ADNmt), el cual tiene una tasa de cambio mayor a nivel intraespecífico, debido a las elevadas tasas de mutación propias de su ubicación en el ambiente oxidativo mitocondrial, no procede de la recombinación de los genes sino que es uniparentalmente heredado y tiene un alto nivel de conservación en su contenido entre diferentes eucariotas, con pocas duplicaciones, ausencia de intrones y regiones intergénicas relativamente cortas; adicionalmente, es fácil de amplificar por PCR dada la presencia de múltiples copias en cada célula (Figura 1) (García et al. 2013). Lo anterior fue aprovechado por Martin y Coffey (2012), quienes evaluaron y establecieron un grupo de *loci* que pueden ser empleados en el estudio de la variación genética en *P. cinnamomi*, y desarrollaron varios cebadores de los cuales dos pares pueden ser usados para el estudio específico de las poblaciones del fitopatógeno.



otros marcadores como isoenzimas, RFLP, RAPD, AFLP, microsatélites, entre otros, usados en estudios de diversidad genética de *P. cinnamomi* (Linde, 1997; Dobrowolski, 1999; Ochoa et al. 2009; Eggers et al. 2012; Pagliaccia et al. 2013), han estado limitados por la geografía, el rango de hospederos y el tiempo de los aislamientos (Schreier, 2013). La disponibilidad de secuencias de la región ITS de *P. cinnamomi* en el Genbank de diferentes orígenes geográficos, diferentes hospederos y obtenidos en diferentes muestreos, sugiere la utilidad de este *locus* en estudios de poblaciones del fitopatógeno.

Una manera de descartar que se tienen múltiples familias de genes codificantes en las regiones ITS es observar si las muestras analizadas generan más de una banda electroforética en geles de agarosa después de amplificar la región. Así lo explican Boyer et al. (2001) en su trabajo con varias especies de cianobacterias: *Calothrix parietina*, *Scytonema hyalinum*, *Coelodesmium wrangelii* y *Tolypothrix distorta*. Para determinar el problema enfrentado con los ITS, los autores clonaron el gen en *Escherichia coli* y encontraron que su secuencia cambiaba de 347 pares de bases en la especie *C. parientia* a 648 pares de bases en *S. hyalinum*.



**Figura 2.** Estructura de los genes ribosomales en eucariotas y sitios de unión de los cebadores universales basados en las secuencias de las regiones ITS (Vilgalys lab, 2016).

## 4. Objetivos

### A. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las características fenotípicas y moleculares de aislamientos de *Phytophthora cinnamomi* obtenidos de huertos de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia, Colombia.

### B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer una colección de aislamientos de *P. cinnamomi* a partir de material vegetal obtenido de plantas de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia, Colombia.
2. Determinar si hay variabilidad fenotípica entre aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia mediante la descripción de caracteres morfológicos.
3. Determinar la presencia de haplotipos variantes de *P. cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia mediante el análisis de secuencias de la región ITS.
4. Establecer si hay relación entre la variabilidad fenotípica y los variantes haplotípicos encontrados en aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia



## 5. Hipótesis

### A. HIPÓTESIS NULA

No hay variabilidad fenotípica entre aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia.

### HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Hay variabilidad fenotípica entre aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia.

### B. HIPÓTESIS NULA

No hay variantes haplotípicos de *P. cinnamomi* en las diferentes subregiones del departamento de Antioquia.

### HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Hay variantes haplotípicos de *P. cinnamomi* en las diferentes subregiones del departamento de Antioquia.

### C. HIPÓTESIS NULA

No hay relación entre la variabilidad fenotípica y los haplotipos encontrados entre aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia

### HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Hay relación entre la variabilidad fenotípica y los haplotipos encontrados entre aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de plantas de aguacate de diferentes subregiones del departamento de Antioquia.

## 6. Materiales y métodos

### A. ESTABLECIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE *P. cinnamomi*

Para formar la colección de *P. cinnamomi*, se analizó un total de 682 muestras radiculares provenientes de árboles de aguacate de las subregiones productoras del departamento de Antioquia. Las muestras fueron colectadas entre los años 2014 y 2016, con el apoyo de técnicos y profesionales de Corpoica C. I. La Selva y de otras entidades asociadas al proyecto “Desarrollo tecnológico, productivo y comercial del aguacate en Antioquia”, financiado por el Sistema General de Regalías de Antioquia. En el esquema de muestreo se tuvieron tres escenarios:

- **Escenario 1:** Se seleccionaron ocho fincas productoras de aguacate de tres subregiones de Antioquia: Cuatro del Oriente (Dos en El Retiro, una en Rionegro y una en El Peñol), dos del Suroeste (una en Amagá y otra en Jardín) y dos del Altiplano Norte (San Pedro de los Milagros). En cada una de las fincas, se seleccionaron seis bloques, cada uno con 10 árboles aparentemente sanos, de los cuales se tomaron al azar, raíces de tres puntos equidistantes de la zona de goteo, para un total de 480 muestras analizadas.
- **Escenario 2:** Constituido por árboles "criollos" o "escapes". El proyecto macro seleccionó 100 árboles: según sus características físicas, longevidad, producción, calidad, uso como proveedor de semilla; considerando su potencial como portainjertos y para estudios de resistencia. De estos, siete estaban ubicados en el Nordeste de Antioquia, uno en el Altiplano Norte, 38 eran del Oriente Cercano y Lejano, 35 del Suroeste, siete del Occidente y doce de Urabá. El muestreo de las raíces se hizo como se describió anteriormente.
- **Escenario 3:** Consistente en focos de pudriciones radiculares. En 18 fincas productoras de aguacate, registradas ante el ICA (dos del Altiplano Norte, cinco del Suroeste y once del Oriente Antioqueños), se identificaron 3 focos de pudriciones radiculares aparentemente causadas por *P. cinnamomi*; en cada foco se muestreó un árbol con sintomatología y otro "asintomático", completando 6 muestras por finca. Los síntomas de la enfermedad son: declinamiento en la parte terminal, hojas pequeñas y cloróticas (verde pálido, amarillo o amarillo blanquecino), frutos más pequeños, menor productividad. En la raíz se observa podredumbre en las más jóvenes o en las adventicias, de estos árboles se recolectaban raíces parcialmente necrosadas. Los focos también fueron identificados en las fincas del escenario 1, muestreando solo árboles con sintomatología, para un total de 84 muestras en este último escenario.

Una vez en el laboratorio, las raíces fueron desinfectadas con hipoclorito al 1%, alcohol al 70% y agua destilada estéril y en cámara de flujo, fueron cortadas en discos y sembradas en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa - PDA (Merck®) modificado con antibióticos y fungicidas (PDA 39g, Benlate® 0.8 mg/L, Rifampicina SIGMA® 5 mg/L, Ampicilina SIGMA® 250 mg/L, PCNB SIGMA® 20 mg/L, Hymexazol TACHIGAREN® 30 SL Sumimoto corporation Colombia 25 mg/l y 1000ml de agua destilada.). Las cajas eran incubadas a temperatura ambiente, revisándolas diariamente durante 8 días. En los fragmentos donde se observó la aparición de colonias con las características típicas de las colonias de *P. cinnamomi*, estas fueron aisladas y purificadas por el método de resiembra en medio de cultivo PDA (Merck).

Cuando se lograron obtener cultivos puros de los aislamientos, estos fueron conservados ubicando fragmentos de medio colonizado, de un mes de edad, en crioviales con agua destilada estéril; los aislamientos eran reactivados periódicamente para verificar su viabilidad.

### **B. EXTRACCIÓN DE ADN**

La extracción del ADN se realizó utilizando el protocolo reportado por Reader y Broda (1985) y modificado en la Unidad de Biotecnología Vegetal- CIB así: El ADN se obtuvo mediante el método CTAB con micelio de *P. cinnamomi* crecido en caldo *Sabouraud* durante, por lo menos, 5 días. El micelio desarrollado de cada aislamiento, fue filtrado, sumergido en nitrógeno líquido y macerado en un mortero hasta convertirlo en un polvo fino y procurando mantener el montaje frío con el nitrógeno líquido el máximo tiempo posible. Los macerados fueron depositados en tubos *ependorf* de 1.5 ml, a los cuales se les agregaron 700 µl de *buffer* CTAB 2X (precalentado a 65 °C y 4 µl de β-mercaptoetanol en cámara de extracción. Las muestras se incubaron a 65°C por 45 min agitando periódicamente. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 700µl de Cloroformo-Alcohol isoamílico 24:1, la suspensión se homogenizó y centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos; a continuación, el sobrenadante fue recuperado y pasado a un tubo nuevo, luego, se le adicionó un volumen de cloroformo (~700 µl) y se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se pasó a otro tubo, al cual se le adicionó un volumen de Isopropanol, esta mezcla fue reposada a -20°C por 1 hora (precipita el ADN), al cabo de este tiempo, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 min, eliminando el sobrenadante. Finalmente, el *pellet* fue lavado con 200 µl de etanol al 70% y centrifugado a 12000 rpm por 10 min, nuevamente se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior, pero con etanol al 90%. El ADN obtenido fue resuspendido con 50 µl de agua ultrapura estéril. La concentración fue cuantificada con *Nanodrop* (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE), usando aquellas suspensiones de ADN que presentaran una

relación 260/280 entre 1.8 y 2.0; además se garantizó la integridad del ADN corriendo las muestras en geles de agarosa al 1% a 70V por 30 min. La tinción se hizo con *GelRed* (2 µl/ml) y el resultado fue observado en un fotodocumentador de luz UV. Las suspensiones de ADN fueron mantenidas a -20°C hasta el momento de su uso.

### **C. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ITS**

La amplificación por PCR de la región ITS fue llevada a cabo en una mezcla de reacción de 30 µl que contenía 1X *buffer* de PCR, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTP, 0.2 µM del cebador *ITS1* (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), 0.2 µM del cebador *ITS4* (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), 1 U/µl de Taq polimerasa y 50-100 ng/µl de ADN blanco, el volumen se completó con agua ultrapura estéril.

Las amplificaciones fueron realizadas en un Termociclador iCycler-BioRad™ (BioRad, EE. UU.) con los siguientes parámetros de corrido: una desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 5min., seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 min para desnaturalizar, 50°C por 1 min para la hibridación y una extensión a 72°C por un minuto, se programó un ciclo adicional a 72°C por 5 min para la extensión final. En todos los casos, la mezcla sin el ADN blanco fue usada como control negativo, mientras que los aislamientos que ya han sido secuenciados e identificados sirvieron como controles positivos.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa 1% con *GelRed* a 70 V por 40 min y un marcador de peso de 100 pb permitió seleccionar aquellas muestras con un tamaño entre 750 y 850 pb, el esperado para oomicetes. Cada producto de PCR fue enviado a Macrogen INC (Corea del Sur) para su purificación y secuenciación.

### **D. PCR-RFLP DE LAS REGIONES *trnG-rns* Y *rns-nad3* DEL ADN MITOCONDRIAL**

Los *loci* a ser empleados en el análisis, *trnG-rns* y *rns-nad3*, fueron seleccionados por Martin y Coffey (2012), por su capacidad para diferenciar haplotipos mitocondriales de *P. cinnamomi* en una colección de California. Las amplificaciones fueron realizadas usando 50-100 ng/µl de ADN blanco, 0.2 mM de cada uno de los cebadores (*trnG-rns* Phy Intra-F1 5'GGTAGAGTATAACCTTGC 3' / Phy Intra-R1 5'ATAGCATTTATTCTGAGCCA3' y *rns-nad3* RN-CoxF 5'GATGAAGTCGTAACAAGGTA3' / RN-nad3Rb 5'TGTTTATATTTGGTGTAGTGAT3'), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM dNTP, 1X de *buffer* de amplificación y 1 U/de Taq polimerasa, el volumen de

30 µl fue completado con agua ultrapura estéril. Las amplificaciones fueron realizadas en un Termociclador iCycler-BioRad™ (BioRad, EE. UU.) con las siguientes condiciones: un ciclo a 94°C por 5 min; 30 ciclos a 94°C por 1 min, 57.5°C y una extensión a 72°C por 2 min; se programó un último ciclo a 72°C por 5 min para la extensión final. La amplificación fue confirmada corriendo las muestras en gel de agarosa al 1%.

Los productos de la amplificación de la región intergénica *rns-nad3*, fueron digeridos por separado con las enzimas *SwaI* y *MwoI*. Mientras que los productos de la amplificación de la región *trnG-rns* fueron digeridos con la enzima de restricción *PsiI* (Tabla 1). Para todas las enzimas se usaron las siguientes condiciones: 1.0 µl de *buffer* Tango 10X (*Buffer* O para la enzima *SwaI*), 0.5 µl de enzima (*SwaI/MwoI/PsiI*), 1 µl del producto de la PCR, y se completó con 7.5 µl de agua ultrapura estéril, incubando durante 3 h a 30°C las reacciones con *SwaI* y a 37°C las de *MwoI* y *PsiI*. El perfil de bandas obtenido fue verificado por electroforesis en geles de agarosa al 2.5% tiñendo con *GelRed* y corriendo a 50 V por 1 h, visualizándolo en un fotodocumentador con luz UV.

**Tabla 1.** Tamaños de las bandas (pb) esperadas de la digestión del producto de la amplificación de las regiones *rns-nad3* y *trnG-rns* con las enzimas de restricción *SwaI*, *MwoI* y *PsiI*.

ENZIMA	SITIOS DE CORTE	TAMAÑOS DE BANDA ESPERADOS
<i>SwaI</i>	ATTT^AAAT	227, 251, 557, 947
<i>MwoI</i>	GCNNNNN^NNGC	416, 506, 833
<i>PsiI</i>	TTA^TAA	184, 308, 629

## E. ANÁLISIS FENOTÍPICO

Para establecer diferencias morfológicas coloniales en la población de *P. cinnamomi* en estudio en condiciones de laboratorio, se examinaron la forma y las tasas de crecimiento de las colonias de cada uno de los aislamientos. Para ello, discos de 7 mm de diámetro de medio PDA (39 g/l) colonizados provenientes del margen de cultivos con 30 días de crecimiento, fueron transferidos al centro de cajas de 90 x 60 cm con 20 ml de medio PDA e incubados a 20°C. Para cada aislamiento se hicieron tres repeticiones diarias y tres réplicas en el tiempo (1 mes). Transcurridas 48 horas después del montaje, se trazó el margen de cada colonia con marcador de punta fina y el diámetro fue medido empleando un pie de rey, esto se hizo cada día de ahí en adelante hasta que el primer aislamiento alcanzara el margen de la caja, es decir, durante 7 días (5 mediciones). Dado que la colonia de *P. cinnamomi* no presenta un crecimiento radial regular, las mediciones se hacían a partir de una línea

de referencia en dos puntos perpendiculares de la colonia en crecimiento, para posteriormente obtener un promedio de las dos.

Por otro lado, para las comparaciones de la forma de la colonia, discos de 7 mm de PDA colonizados fueron ubicados en cajas de petri con medio PDA e incubados a 20°C por 15 días, tiempo después del cual se registró la morfología como roseta (patrón similar a una flor), estrella (patrón similar a una estrella) o sin patrón. Para cada aislamiento se hicieron tres repeticiones diarias y tres réplicas en el tiempo (1 mes).

Las características fenotípicas de *P. cinnamomi* relacionadas con el diámetro y la tasa de crecimiento de la colonia fueron analizadas con un análisis de varianza (MLG) debido a que son caracteres continuos. Para ello, se tuvieron en cuenta las variables: subregión de origen, cultivar, estado del árbol y forma de la colonia, con el fin de determinar si existen diferencias significativas en los promedios de éstas (el diámetro y la velocidad de crecimiento de la colonia) y si habían interacciones entre las variables evaluadas (Sokal & Rolf, 1995). Adicionalmente, se realizaron pruebas de Chi cuadrado para encontrar algún tipo de asociación entre los caracteres categóricos obtenidos en este trabajo: morfología (roseta, estrellada, sin patrón), haplotipos (H1, H2, H3, H4 y H5), y los genotipos obtenidos con la técnica de PCR- RFLP en las regiones intergénicas del gen mitocondrial de esta especie respecto a su origen geográfico (Altiplano Norte, Suroeste, Oriente) y características de su hospedero (asintomático vs sintomático, comercial vs criollo). Estos análisis se realizaron en el paquete estadístico R (Versión 1.0.44).

## F. ANÁLISIS DE GENÉTICA DE POBLACIONES

La secuenciación de la región ITS del ADNr fue realizada por Macrogen Inc (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas (*forward* y *reverse*) fueron visualizadas y ajustadas manualmente usando el programa bioinformático Geneious 5.3.6 (Biomatters disponible en <http://www.geneious.com>). El ajuste manual consistió en la eliminación de los extremos de las secuencias nucleotídicas y en la resolución de posiciones ambiguas con base en los cromatogramas. Una vez que ambas secuencias por individuo fueron ajustadas, se hizo un alineamiento pareado con el algoritmo Clustal W (Larkin et al. 2007) en el mismo software y se estimó la secuencia consenso. La integridad e identidad de las secuencias por individuo fueron evaluadas mediante un Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y finalmente se hicieron alineamientos múltiples mediante ClustalW usando para ello el programa bioinformático Mega 6.0 (Kumar et al. 2008).

Las comparaciones de las secuencias de ADN que incluyeron la identificación de los haplotipos y los sitios polimórficos fueron realizadas con el programa DNAsp V5 (Librado & Rozas, 2009). Las secuencias fueron analizadas en cuanto a su diversidad nucleotídica con el estimativo  $\Pi$  y al polimorfismo nucleotídico con  $\theta$  (Hartl & Clark, 1997).  $\Pi$  determina el promedio de la proporción de diferencias nucleotídicas entre todos los pares de secuencias de una muestra, que en este caso son las muestras de *P. cinnamomi* obtenidas de cultivos de aguacate del departamento de Antioquia, el cual es igual a:

$$\Pi = N/(N-1) \sum p_i p_j \Pi_{ij},$$

Donde N es el número de secuencias analizadas;  $p_i$  es la frecuencia de la secuencia “i” y  $\Pi_{ij}$  es la proporción de nucleótidos que difieren entre las secuencias de ADN comparadas  $i^{\text{th}}$  y  $j^{\text{th}}$  (Hartl & Clark, 1997; Nei & Kumar, 2000). Por otro lado,  $\theta$  se relaciona con la proporción de nucleótidos que se espera que sean polimórficos en cualquier muestra tomada del genoma de un organismo. Siendo

$$q = S/a_1,$$

$$a_1 = S \sum 1/i,$$

Donde n es el tamaño de la muestra (número de marcadores utilizados para el análisis); S es el número de fragmentos polimórficos generados por cada marcador e i es n-1 (Hartl & Clark, 1997).

A nivel de la población, se calculó el tamaño efectivo que corresponde a  $N_{ef}$ , cuando se determina el tamaño efectivo de las hembras, mientras que el tamaño efectivo total de la población es  $N_e = N_{ef} * 4$  (Hedrick, 2004). Esto en caso de que se trabaje con un gen nuclear como los ITS que tienen herencia biparental (Hedrick, 2004). El tamaño efectivo tiene una relación directa con el estimador de polimorfismo nucleotídico de esta forma  $\theta = 4N_e \mu$ , donde  $N_e$  = tamaño efectivo de la población  $\mu$  = tasa de mutación y  $\theta$  = polimorfismo nucleotídico (Hedrick, 2004).

El análisis AMOVA (Análisis molecular (jerárquico) de poblaciones), fue realizado para determinar si las poblaciones de *P. cinnamomi* se encuentran genéticamente diferenciadas, para ello se utilizó el programa Arlequín 3.11 (Excoffier et al. 1992, 2005). El AMOVA, fue inicialmente desarrollado para estimar la diversidad genética de poblaciones usando un análisis de varianza en poblaciones con frecuencias moleculares haplotípicas de organismos haploides, sin embargo, este mismo modelo también puede ser usado para organismos diploides (Michalakis & Excoffier, 1996). Los estadísticos F estiman la diversidad genética entre, dentro y total de una población muestreada, en este trabajo

se usó el estadístico  $\Phi_{ST}$  análogo al  $F_{ST}$ , debido a que puede ser usado para datos haploides y binarios de organismos diploides, mientras que por el contrario el  $F_{ST}$  fue desarrollado por Wright para el análisis de datos codominantes (Peakall & Smouse, 2006) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), P es el número de poblaciones muestreadas, Ni es el tamaño de cada muestra y  $N = \sum Ni$  es el número total de individuos. gl: grados de libertad, SSD: desviación de la suma de cuadrados, MSD: media de la desviación de los cuadrados, E (MSD): media esperada de la desviación de los cuadrados.

<b>FUENTE DE VARIACIÓN</b>	<b>GI</b>	<b>SSD</b>	<b>MSD</b>	<b>E(MSD)</b>
Entre poblaciones	$P - 1$	$SSD(AP)$	$SSD(AP)/(P - 1)$	$\sigma_w^2 + n' \sigma_a^2$
Entre genes dentro de poblaciones	$2N - P$	$SSD(WP)$	$SSD(WP)/(2N - P)$	$\sigma_w^2$
<b>Total</b>	$2N - 1$	$SSD(T)$		

En el caso del  $\Phi_{ST}$ , cada haplotipo i es tratado como un vector de un estado alélico  $a_i$ , de dimensión igual al número de *loci* considerados (m), entonces  $a_i = [a_{i1}, a_{i2}, a_{i3} \dots a_{im}]'$ .  $\Phi_{ST}$  es obtenido como el cociente de la varianza estimada debido a diferencias entre las poblaciones ( $\sigma_a^2$ ) sobre la varianza total estimada ( $\sigma^2 = \sigma_a^2 + \sigma_w^2$ ) (Michalakis & Excoffier, 1996; Peakall & Smouse, 2006):

$$\phi_{ST} = \frac{\hat{\sigma}_a^2}{\hat{\sigma}^2}$$

El  $\Phi_{ST}$ , en términos de las desviaciones de la suma de cuadrados (SSDS) se define de la siguiente forma (Michalakis & Excoffier, 1996):

$$\hat{\phi}_{ST} = \frac{(2N - P)SSD(T) - (2N - 1)SSD(WP)}{(2N - P)SSD(T) - (2N - 1 - b)SSD(WP)}$$

Donde b es igual a  $n'(P - 1)$ , y  $n'$  es igual a:

$$n' = \frac{1}{P-1} \left( 2N - \sum_{i=1}^P \frac{(2N_i)^2}{2N} \right)$$

La desviación de la suma de cuadrados (SSD) es la función de los vectores haplotípicos:

$$SSD(T) = \frac{1}{2N} \sum_{i=1}^{2N} \sum_{j=1}^i \delta_{ij}^2$$

$$SSD(WP) = \sum_P \frac{1}{2N_r} \sum_{i=1}^{r-1} \sum_{j=1}^{r-1} \delta_{ij}^2$$

Donde N es el tamaño de la muestra que se está analizando y  $\delta_{ij}^2$  es una distancia Euclidiana ajustada entre los haplotipos i y j definidos como:

$$\delta_{ij}^2 = (a_i - a_j)'W(a_i - a_j)$$

Siendo W una matriz de m x m que permite que se observen las interacciones entre *loci*. Si los *loci* se asumen como independientes y se les da igual peso, W es la matriz de identidad I, donde:

$$\delta_{ij}^2 = \sum_{k=1}^m (a_{ik} - a_{jk})^2$$

Bajo este supuesto de independencia entre *locus*, la desviación de la suma de cuadrados puede dividirse en componentes de *locus* simples (m):

$$\hat{\phi}_{ST} = \frac{(2N-P) \sum_{i=1}^m SSD(T)_i - (2N-1) \sum_{i=1}^m SSD(WP)_i}{(2N-P) \sum_{i=1}^m SSD(T)_i - (2N-1-b) \sum_{i=1}^m SSD(WP)_i}$$

Que es igual a:

$$= \frac{\sum_{k=1}^m \hat{\sigma}_{\alpha i}^2}{\sum_{k=1}^m \sigma_i^2}$$

El AMOVA considera entonces a cada *locus* como independiente dado que W = I (Michalakis & Excoffier, 1996).

Para realizar el AMOVA cuando se tienen datos haploides de organismos diploides se deben generar haplotipos simulados con los que se calculan las frecuencias para construir una matriz de distancias euclidianas (Michalakis & Excoffier, 1996); por esta razón se usó la distancia genética binaria propuesta por Huff y colaboradores (1993) y usada por el programa GENEALX 6 (Peakall & Smouse, 2006), es una modificación de la distancia métrica de Nei en una distancia euclidiana que corrige los estimadores de diferenciación poblacional (Huff, Peakall & Smouse, 1993). El AMOVA prueba la significancia de la diferenciación de las poblaciones por permutaciones al azar, si los *loci*

que componen los haplotipos son estadísticamente independientes, las permutaciones de los haplotipos simulados a lo largo de las poblaciones generan un procedimiento conservador en el sentido que los niveles de significancia pueden ser sobrestimados porque la distribución empírica nula puede ser más platicúrtica que la verdadera distribución nula (Michalakis & Excoffier, 1996).

Adicionalmente, el AMOVA determina el número de migrantes ( $N_m$ ) con la siguiente fórmula, siguiendo el enfoque de los estadísticos F de Wright:

$$Nm = \frac{(\frac{1}{F_{ST}}) - 1}{4}$$

Además, el programa Arlequín fue utilizado para obtener los datos de la prueba de neutralidad de Tajima-Nei (1984) para establecer si las poblaciones del fitopatógeno han sufrido una expansión reciente, una contracción reciente o han permanecido de tamaño constante. La prueba de neutralidad se basa en el estimador D, que equivale a  $D = \Theta \Pi - \Theta k$ , siendo  $\Pi = N/(N-1) \sum p_i p_j \Pi_{ij}$ , como se explicó con anterioridad y  $k = K / \sum 1/i$ , donde K = número de sitios segregantes, N = número de secuencias evaluadas en una muestra e  $i = N-1$ . Cuando  $D < 0$ , la población ha sufrido una expansión reciente o pasado por un efecto de selección natural purificadora,  $D > 0$ , la población ha pasado por una reducción reciente por un cuello de botella y cuando  $D = 0$ , la población permanece de tamaño constante.

Finalmente, el programa Network 4.5.1.0 (Fluxus technology, 2010) fue utilizado para construir las redes haplotípicas para producir redes de tipo Median-Joining (MJ) a fin de establecer las conexiones genéticas entre los haplotipos estimados por el programa DNAsp.

Por otro lado, los datos obtenidos de las PCR-RFLP con las regiones intergénicas *trnG-rns* y *rns-nad3* del ADN mitocondrial, fueron evaluados cada uno de ellos como valores binarios (ausencia (0) y presencia (1)) de cada perfil de bandas realizado por las enzimas de restricción evaluadas en este trabajo y a partir de los mismos se realizaron análisis adicionales de la estructura poblacional con el programa GENALEX 6.501 (Peakal & Smouse, 2006) con 99999 permutaciones.

Adicionalmente, se calculó la distancia de Nei entre las poblaciones pareadas de las regiones evaluadas en Antioquia (Oriente, Suroeste y Altiplano Norte). Esta distancia asume un modelo infinito de mutación en isoalelos, en los cuales la tasa de mutación neutral se genera por la evolución de alelos completamente nuevos en las poblaciones de estudio (Nei, 1973, 1975). Esta tasa de

mutación es constante y existe un equilibrio entre la mutación y la deriva genética de las poblaciones, donde el tamaño efectivo ( $N_e$ ) permanece constante. Esta distancia genética no asume equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1973, 1975), por esta razón fue usada para el análisis de los datos de este estudio. La distancia de Nei se define como (Nei, 1979):

$$D_{Nei} = -\ln(I)$$

donde  $I$  es la identidad genética que se define como:

$$I = \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}$$

donde:

$$J_{XY} = \sum p_{ix} p_{iy}$$

$$J_X = \sum p_{ix}$$

$$J_Y = \sum p_{ij}$$

$p_{ix}$  y  $p_{iy}$  son las frecuencias del alelo  $i$  en las poblaciones  $x$  y  $y$ . Para múltiples *loci*  $J_{XY}$ ,  $J_X$  y  $J_Y$  son calculados sumando todos los *loci* y alelos y dividiendo por el número de *loci* (Peakall & Smouse, 2006).

Las distancias de Nei finalmente fueron analizadas con dendrograma con el algoritmo *Neighbor Joining* (NJ), que se basa en la agrupación de las poblaciones representadas por las tres regiones de Antioquia muestreadas, teniendo en cuenta la distancia genética entre las poblaciones vecinas más cercanas; iniciando con una estructura de árbol en estrella (Nei & Kumar, 2000). El algoritmo para la construcción de dendrogramas NJ generalmente es usado cuando no se conoce la tasa de sustitución nucleotídica de una secuencia o cuando se asume que un gen no tiene que cumplir la ley del equilibrio de Hardy Weinberg (Hartl & Clark, 1997). Este método asume que todas las secuencias o relaciones genéticas entre los OTUS (Unidades taxonómicas operativas) están en un principio relacionadas en un árbol a manera de estrella, por lo que se produce en un árbol con  $N$  grupos o secuencias cuya longitud de rama es  $S_o = \sum dij / (N-1)$ , siendo  $dij$  = distancia genética entre los OTUS  $i$  y  $j$ . Posterior a la creación de este árbol, se calculan las longitudes de ramas entre las parejas de todos los OTUS evaluados ( $S_{ij}$ ) hasta conseguir un dendrograma bifurcado. Este dendrograma se obtiene al calcular las longitudes de rama  $S_{ij}$  para estos pares de OTUS teniéndose en cuenta que la distancia del nodo  $K$  a cada par de OTUS es  $dij = \frac{1}{2} (dik+djk)$ , siendo  $dij$  = distancia entre los OTUS

$i$  y  $j$  y  $d_{ik}$  = distancia del OTUS  $i$  al nodo  $K$  y  $d_{jk}$  = distancia del OTUS  $j$  al nodo  $k$  (Saitou & Nei, 1987). |

Finalmente, se realizó un análisis Bayesiano de grupos y asignación de genotipos de cada una de las muestras evaluadas de las tres regiones con el uso del programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000) para medir la probabilidad de pertenencia a un grupo o *cluster* para cada uno de los individuos de estas regiones de Antioquia. Éste programa fue corrido con una cadena Markov Monte Carlo de 1000000 de pasos después de un periodo de 50000 iteraciones y un *burning period* de 5000 desde  $K=2$  hasta  $K=11$ . Cada  $K$  fue calculado en 10 corridas independientes. La probabilidad estimada *ad hoc* de  $K$  (delta  $K$ ) (Evanno et al. 2005) fue empleada para estimar el número más probable de poblaciones ( $K$ ) basado en la tasa de cambio en la probabilidad logarítmica de los datos [ $\ln Pr(X/K)$ ] que representa la probabilidad bayesiana.

## 7. Resultados

### A. ESTABLECIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE *P. cinnamomi*

De las 664 muestras radiculares analizadas, se obtuvieron 151 aislamientos, de los cuales, 112 fueron seleccionados para la caracterización morfológica teniendo en cuenta la distribución geográfica de los árboles hospederos. Adicionalmente, se obtuvo la secuencia de la región ITS en 109 muestras del fitopatógeno (según la calidad obtenida) y 112 muestras fueron analizadas por medio de una PCR-RFLP. En la selección de este material, se procuró un balance entre los aislamientos provenientes de muestras radiculares de árboles sintomáticos y de árboles asintomáticos, los provenientes de las subregiones Oriente, Suroeste y Altiplano Norte de Antioquia y de los cultivares de uso comercial y de “criollos” o “escapes”. Los aislamientos fueron depositados en la colección biológica MicroCIB (#223) del Registro Nacional de Colecciones Biológicas del Instituto Von Humboldt (Tabla 3).

**Tabla 3.** Relación de las muestras totales analizadas (ver anexo 1).

ESCENARIO	SUBREGIÓN	MUESTRAS ANALIZADAS	POSITIVAS	SELECCIONADAS
COMERCIAL	Suroeste (Asintomáticos)	120	30 (25%)	26
	Altiplano Norte (Asintomáticos)	120	2 (1.67%)	2
	Oriente (Asintomáticos)	240	60 (25%)	28
CRIOLLOS	Noreste (Asintomáticos)	7	0	0
	Altiplano Norte (Asintomáticos)	1	0	0
	Occidente (Asintomáticos)	7	0	0
	Oriente (Asintomáticos)	37	4 (10.81%)	4
	Oriente (Sintomáticos)	1	1 (100%)	1
	Suroeste (Asintomáticos)	35	4 (11.43)	4
	Urabá	12	0	0
FOCOS DE PUDRICIÓN	Suroeste (Asintomáticos)	9	1 (11.11%)	1
	Suroeste (Sintomáticos)	15	13 (86.67%)	13

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

Altiplano Norte (Asintomáticos)	0	0	0
Altiplano Norte (Sintomáticos)	6	4 (66.67%)	4
Oriente (Asintomáticos)	21	4 (19.05%)	2
Oriente (Sintomáticos)	33	28 (84.85%)	27
<b>TOTAL</b>	<b>664</b>	<b>151 (22.74%)</b>	<b>112</b>

## B. SECUENCIACIÓN

La amplificación y edición final de las secuencias obtenidas de la región ITS del ADNr produjo amplicones de 703 pb, en 109 individuos de *P. cinnamomi* de Antioquia. Estas secuencias mostraron un alto nivel de homología con otros *P. cinnamomi* reportados en el GenBank (>99%), usando BLASTn, validando así la identidad de los aislamientos.

## C. ANÁLISIS FENOTÍPICO

Se realizó la caracterización del crecimiento de la colonia y de la morfología en 111 aislamientos del fitopatógeno en medios PDA (en laboratorio a 20°C) por siete días (ver anexo 1). Los aislamientos exhibieron tres morfologías: una en forma de roseta, otra en forma de estrella y unos aislamientos no presentaron patrón (Figura 3). La roseta fue la más común presentándose en el 81.25% de los aislamientos, mientras que la forma estrellada se presentó en el 14.29%; un 4.46% de los aislamientos no mostraron ningún patrón (Tabla 4).

Para el caso del diámetro y las tasas de crecimiento de las colonias del fitopatógeno, se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación múltiple de medias con Tukey. Este análisis demostró que existen diferencias significativas entre los aislamientos en ambas variables debido a que los diámetros promedio del fitopatógeno, oscilaron en rangos entre 3.31 y 7.97 cm y sus tasas de crecimiento entre 0.293 y 1.126 cm/d.



**Figura 3.** Aislamientos de *P. cinnamomi* exhibiendo una morfología de colonia en roseta (izquierda), en estrella (medio) y sin patrón (derecha) en medio PDA.

**Tabla 4.** Crecimiento promedio y desviaciones estándar de colonias de aislamientos de *P. cinnamomi* agrupados por morfología de la colonia, origen geográfico, condición fitosanitaria del árbol hospedero y cultivar.

Caracter	MORFOLOGÍA			SUBREGIÓN			ESTADO DEL ÁRBOL		CULTIVAR	
	R <sup>a</sup>	E <sup>b</sup>	SP <sup>c</sup>	O <sup>d</sup>	SO <sup>e</sup>	N <sup>f</sup>	A <sup>g</sup>	S <sup>h</sup>	CO <sup>i</sup>	CR <sup>j</sup>
<b>Roseta</b>	91	-	-	50	35	6	54	37	84	7
<b>Estrella</b>	-	16	-	8	8	-	9	7	14	2
<b>Sin Patrón</b>	-	-	5	4	1	0	3	2	5	0
<b>Diámetro promedio (cm)</b>	5.91± 0.92	4.25± 0.63	5.68± 1.08	5.76± 1.02	5.54± 1.14	5.66± 0.82	5.85± 1.07	5.40± 1.00	5.66± 1.09	5.72± 0.69
<b>Crecimiento promedio (cm/d)</b>	0.72± 0.15	0.47± 0.10	0.76± 0.16	0.71± 0.16	0.66± 0.18	0.69± 0.13	0.72± 0.17	0.64± 0.16	0.69± 0.18	0.69± 0.11

<sup>a</sup>Roseta, <sup>b</sup>Estrella, <sup>c</sup>Sin Patrón, <sup>d</sup>Oriente, <sup>e</sup>Suroeste, <sup>f</sup>Altiplano Norte, <sup>g</sup>Asintomático, <sup>h</sup>Sintomático, <sup>i</sup>Comercial, <sup>j</sup>Criollo

Para establecer el efecto de las variables de: subregión de origen, cultivar, condición fitosanitaria del árbol y morfología de la colonia, y de su interacción, se utilizó un Modelo Lineal General (MLG), una vez probados los supuestos de normalidad (Shapiro Wilk) y de homogeneidad de varianzas (Levene). En este análisis se encontró que existen diferencias significativas en el diámetro promedio de las colonias del fitopatógeno en los dos diferentes estados del árbol (sintomático/asintomático), y entre las morfologías de las colonias (roseta, estrella y sin patrón) y que éstas dos variables influyeron en las variables de subregión y cultivar debido a que interactuaron con ambas produciendo valores *p* significativos (Tabla 5). Las colonias en forma de roseta y sin patrón crecen más rápido que las

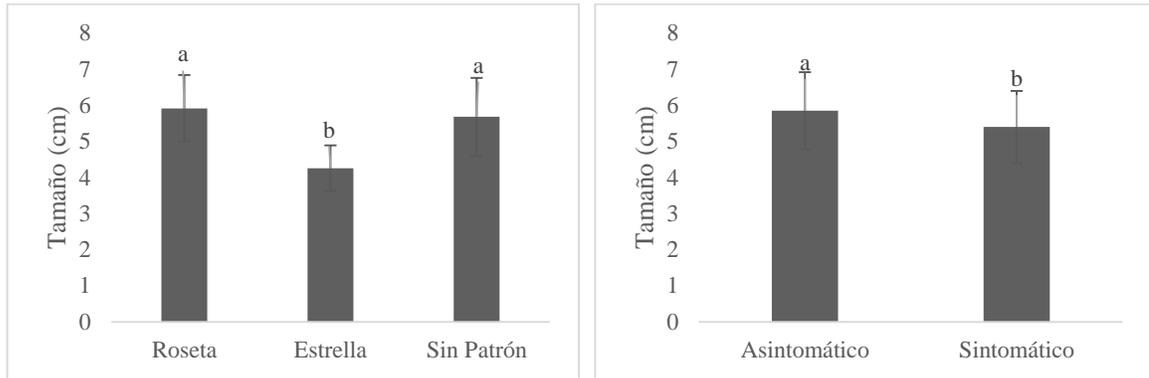
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

colonias en forma de estrella, alcanzando un diámetro final de más de un centímetro de diferencia. De igual manera, las colonias provenientes de árboles sin sintomatología asociada a pudrición radicular causada por *P. cinnamomi*, presentaron diámetros más grandes y demostraron ser más rápidas para crecer que las provenientes de árboles enfermos (Figura 4).

**Tabla 5.** Efecto de la subregión de origen, cultivar, condición fitosanitaria del árbol y morfología de la colonia sobre el diámetro promedio de las colonias de *P. cinnamomi*

<b>Fuente</b>	<b>gl</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
Estado del árbol (E)	1	6.45	6.453	9.601	<b>0.00258*</b>
Subregión (SR)	2	1.85	0.923	1.373	0.25836
Cultivar (C)	1	0.04	0.043	0.064	0.80046
Morfología (M)	2	35.02	17.511	26.054	<b>1.08e-09 ***</b>
E x SR	2	4.92	2.459	3.658	<b>0.02960 *</b>
E x C	1	0.42	0.415	0.618	0.43383
SR x C	1	0.08	0.084	0.125	0.72406
E x M	2	2.78	1.390	2.068	0.13229
SR x M	2	2.07	1.035	1.541	0.21974
C x M	1	5.21	5.214	7.758	<b>0.00649 **</b>
E x SR x M	1	0.68	0.678	1.009	0.31778
SR x C x M	1	0.20	0.203	0.302	0.58422
<b>Residuos</b>	92	61.83	0.672		



**Figura 4.** Efecto de la morfología de las colonias (izquierda) y del estado del árbol (derecha) sobre el tamaño de las colonias (Prueba de rangos múltiples de Duncan.  $\alpha=0.05$ )

#### D. ANÁLISIS DE GENÉTICA DE POBLACIONES A PARTIR DE ADN<sub>r</sub>

Se obtuvieron 109 secuencias de *P. cinnamomi*. Los resultados arrojados por el AMOVA, produjeron un valor de  $F_{ST}$  no significativo, por lo que mostraron que no hay diferenciación genética entre las sub-poblaciones de la especie analizada (Sano-Oriente, Sano-Suroeste, Sano-Norte, Enfermo-Oriente, Enfermo-Suroeste, Enfermo-Norte), y, por ende, no hay una estructuración poblacional. Adicionalmente, el valor de  $F_{ST}$  fue negativo, lo cual sugiere que en Antioquia predomina la reproducción clonal, puesto que los valores de  $F_{ST}$  negativos solo se obtienen en especies con un alto grado de endogamia cuando se utiliza el programa Arlequín en el análisis de datos genéticos (Tabla 6). Sin embargo,

**Tabla 6.** Análisis de Varianza Molecular realizado en 109 secuencias de ADN de *P. cinnamomi* del departamento de Antioquia.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	5	355.827	-1.03782 Va	-1.19
Dentro de poblaciones	103	9087.439	88.22756 Vb	101.19
Total	108	9443.266	87.18974	
Índice de Fijación		$F_{ST} = -0.01190$	$p = 0.8539$	

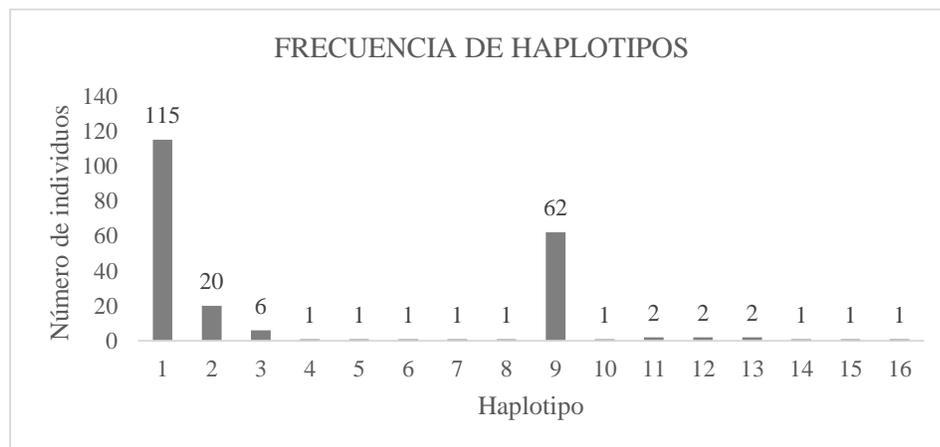
Cuando se identificaron los haplotipos, se confirmó la baja diferenciación genética entre ellos dado que los individuos analizados (N= 109) solo se agruparon en cinco haplotipos entre los cuales el haplotipo 1 (H1) contenía el 38.5% de las secuencias, el haplotipo 2 (H2) el 56.9% mientras que los

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

haplotipos 3, 4 y 5 se distribuyeron el porcentaje restante con 0.92%, 0.92% y 1.83% respectivamente, de éstas secuencias (ver anexo 1). Los estimadores de diversidad genética para Antioquia de esta especie produjeron los siguientes valores:  $H = 5$ ,  $\pi = 0.26739 \pm 0.01103$ ,  $H_d = 0.5235$ ,  $S = 411$  y  $\theta = 0.13902$ .

Posteriormente, se realizó un análisis bioinformático adicional con 109 secuencias de la región ITS del ADNr de *P. cinnamomi* de diferentes países y hospederos reportadas en las bases de datos del *National Center for Biotechnology information* (NCBI) provenientes de Sur África, Brasil, Alemania, Italia, España, Portugal, Taiwán, Francia, Australia, Estados Unidos, Japón, China e Indonesia. Las 218 secuencias totales fueron editadas a mano y alineadas con el algoritmo Clustal W (Cheena et al. 2003, Larkin et al. 2007) con el *software* Mega 6.0 (Kumar et al. 2008). Las comparaciones de las secuencias de ADN que incluyeron la identificación de los haplotipos y los sitios polimórficos fueron realizadas con el programa DNAsp V5. (Librado & Rozas, 2009). El número de haplotipos obtenido fue de 16, siendo el haplotipo 1 el más frecuente (115/218), seguido del haplotipo 9 (62/218), 2 (20/218), 3 (6/218), los haplotipos 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 fueron menos frecuentes, conteniendo uno o dos individuos (Figura 5).

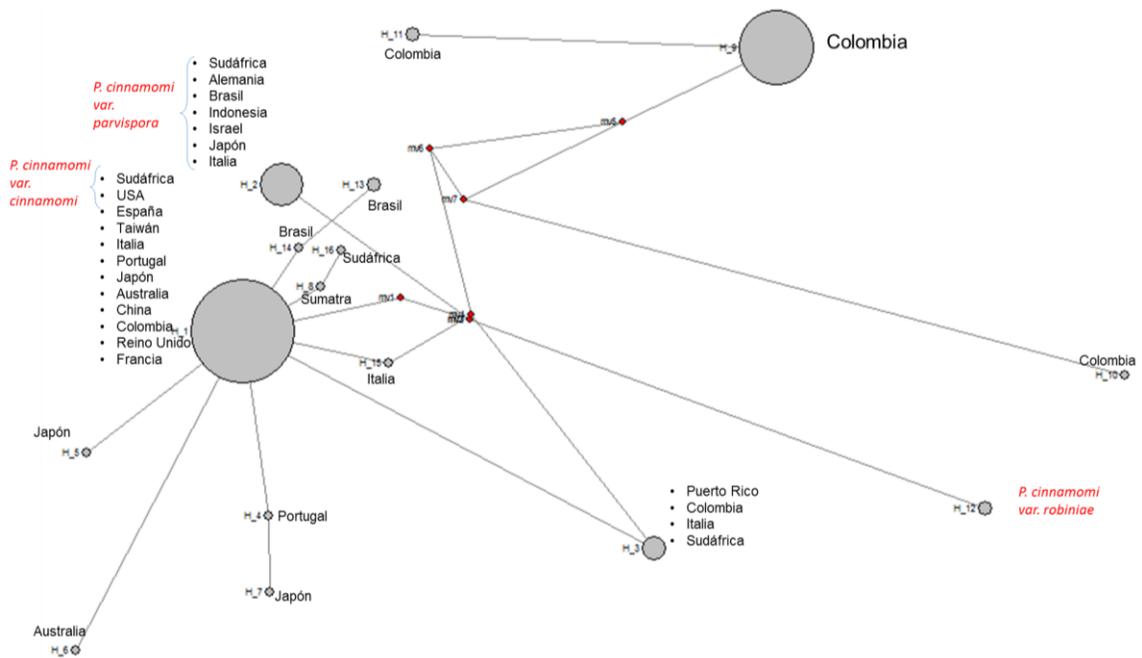


**Figura 5.** Número de individuos pertenecientes a cada uno de los haplotipos de *P. cinnamomi* encontrados en diferentes poblaciones del mundo.

El Haplotype H1 contenía el 40.36% de los individuos procedentes de Colombia junto con individuos de otros países como España, Italia, Taiwán, Portugal, entre otros, y hospederos como alcornoque, castaño e incluso aguacate. El haplotipo H9 por su parte, estuvo conformado únicamente por individuos del fitopatógeno de Colombia, conteniendo el 56.9% de esta población provenientes

exclusivamente de cultivares de aguacate. Los haplotipos H10 y H11, también agruparon solo individuos colombianos, teniendo el 0.92% y el 1.83% de esta población, respectivamente. El otro individuo de Colombia se agrupó en el H3, junto con otras cinco secuencias de otros países. El polimorfismo encontrado se describe con los siguientes parámetros:  $H = 16$ ,  $\pi = 0.2417 \pm 0.01420$ ,  $Hd = 0.634 \pm 0.025$ ,  $S = 432$ ,  $\theta = 0.1375$  y  $d = -0.005$ .

La red haplotípica obtenida con el programa Network, proporcionó una representación visual de las relaciones entre los haplotipos; su proximidad en la red, refleja las similitudes entre los mismos; demostrando diferencias en el haplotipo 9, el cual, prácticamente solo está unido a los haplotipos 10 y 11, constituidos también solo por individuos colombianos (Figura 6).



**Figura 6.** Red haplotípica obtenida para las secuencias de *P. cinnamomi* de diferentes partes del mundo

Adicionalmente, se realizó un análisis de índice de Fijación ( $F_{ST}$ ), con Arlequín 5.1, el cual por especificaciones del *software*, solo tuvo en cuenta 210 de las 218 secuencias *P. cinnamomi*; el análisis indicó que hay un 45.71% de diferenciación genética entre las poblaciones (Tabla 7). Este análisis, a diferencia del anterior realizado solo en muestras colombianas, fue estadísticamente significativo por lo que hay diferenciación genética entre las secuencias del fitopatógeno colectado en diferentes partes del mundo y en diferentes hospederos. Este resultado probablemente demuestre aislamiento por distancia geográfica.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

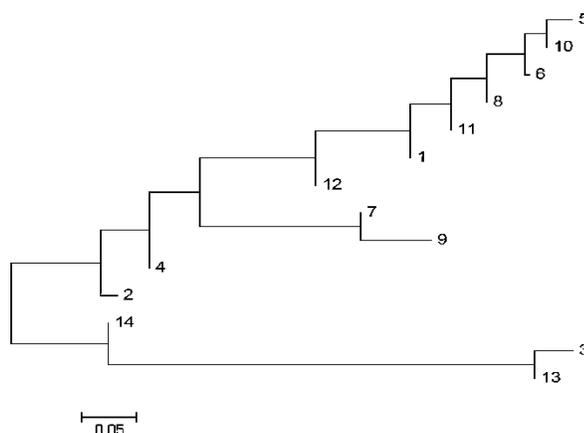
---

Además, este resultado sugiere que el análisis a nivel departamental estuvo limitado por la distribución geográfica de los sitios de muestreo y por el hospedero, y que sería conveniente ampliar el estudio a otros departamentos y otros posibles hospederos que permitan una mayor comprensión de las poblaciones de *P. cinnamomi*.

**Tabla 7.** Análisis de Varianza Molecular realizado en 210 secuencias de ADN de *P. cinnamomi* de diferentes partes del mundo

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre países	13	6860.903	42.15970 Va	45.71
Dentro de los países	196	9814.764	50.07533 Vb	54.29
Total	209	9443.266	92.23503	
Índice de Fijación		<b>F<sub>ST</sub> = 0.45709</b>	<b>P &lt; 0.000001</b>	

El árbol de *Neighbor – Joining*, obtenido mediante el uso de F<sub>ST</sub> pareados, confirmó los resultados obtenidos sobre la estructuración genética evidenciada en el análisis de AMOVA y en la red haplotípica obtenida de las secuencias del fitopatógeno de Colombia y otros países del mundo puesto que la población colombiana presenta diferencias estadísticamente significativas con las poblaciones de Sur África, Brasil, Italia, España, Portugal, Australia, USA, Japón, Indonesia, entre otros (Figura 7).



**Figura 7.** Árbol de Neighbor Joining (NJ) obtenido con los valores  $F_{ST}$  pareados de la región ITS, donde 1) Sur África, 2) Brasil, 3) Alemania, 4) Italia, 5) España, 6) Portugal, 7) Taiwán, 8) Francia, 9) Australia, 10) EE. UU., 11) Japón, 12) China, 13) Indonesia y 14) Colombia.

Por otro lado, el análisis Tajima-Nei demostró que todas las regiones muestreadas en este estudio, con excepción de Japón, se encuentran en un tamaño de población constante, dada la neutralidad calculada en la región por este *test*, indicando que las poblaciones del fitopatógeno de diferentes partes del mundo no están bajo presión de selección, expansión poblacional, cuello de botella o heterogeneidad de la tasa de mutación (Tajima, 1989, 1996). Lo obtenido con Japón sugiere que esta población de *P. cinnamomi* ha sufrido una expansión reciente dado que el valor *p* obtenido con éste estimador fue significativo (Tabla 8).

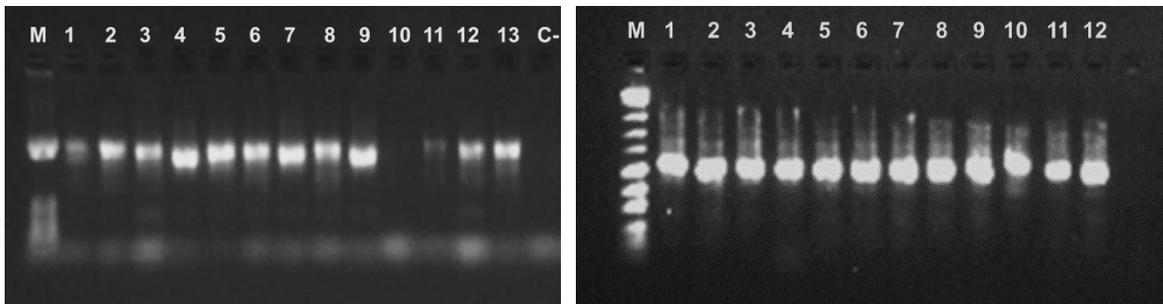
**Tabla 8.** Test de neutralidad Tajima-Nei desarrollado para *P. cinnamomi* en 14 países.

<b>POBLACIÓN</b>	<b>N</b>	<b>D (Tajima-Nei)</b>	<b>P</b>
<b>Sur África</b>	13	-0.91	0.190
<b>Brasil</b>	5	1.62	0.954
<b>Alemania</b>	5	0.00	1.000
<b>Italia</b>	13	2.10	0.991
<b>España</b>	23	0.00	1.000
<b>Portugal</b>	13	-1.15	0.166
<b>Taiwán</b>	2	0.00	1.000
<b>Francia</b>	2	0.00	1.000
<b>Australia</b>	2	0.00	1.000
<b>EE. UU.</b>	9	0.00	1.000
<b>Japón</b>	10	<b>-1.98</b>	<b>0.001</b>
<b>China</b>	2	0.00	1.000
<b>Indonesia</b>	2	0.00	1.000
<b>Colombia</b>	109	4.24	1.000

Finalmente, asumiendo una tasa de mutación de  $\mu = 1 \times 10^{-7}$ , se estimó un tamaño efectivo ( $N_e$ ) para las poblaciones de *P. cinnamomi* a partir de la ecuación  $\Theta = 4N_e\mu$ , encontrándose que  $N_e = 343750$  individuos. El tamaño efectivo corresponde al mínimo número individuos que se requiere en una población para que ésta no pierda su variabilidad genética por efecto de la deriva y por ello su tamaño está relacionado con el número de individuos que actualmente se reproducen en una población y no está relacionado directamente con el número censo de la misma (Pinto et al. 2002; Freeland, 2005). Por esta razón,  $N_e$  es importante para el desarrollo de programas de manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE).

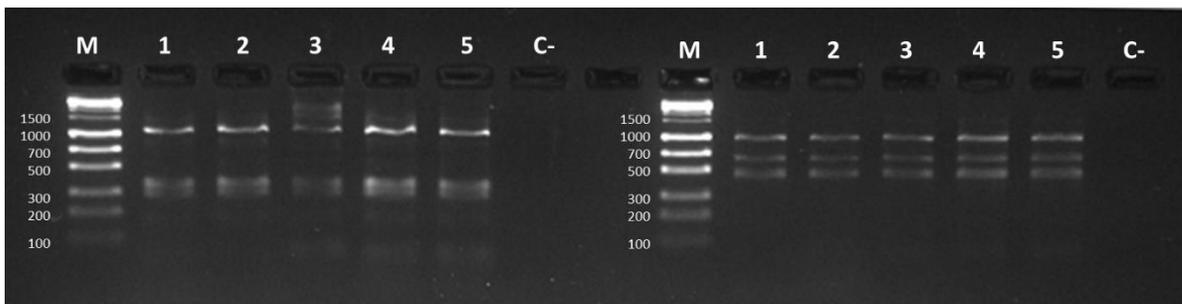
### E. ANÁLISIS DE GENÉTICA DE POBLACIONES POR PCR-RFLP A PARTIR DE ADNmt

La región *trnG-rns* se amplificó en 108 aislamientos, obteniéndose un producto de 1172 pb aproximadamente, mientras que la región *rns-nad3* fue amplificada en 96 aislamientos con un producto de alrededor de 1814 pb (Figura 8).

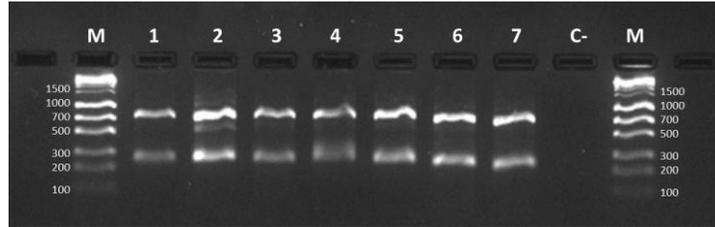


**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% para la visualización de los productos de la amplificación de las regiones intergénicas *rns-nad3* (izquierda) y *trnG-rns* (derecha), donde el pozo de M es el del marcador de peso, los pozos numerados son de aislamientos de *P. cinnamomi* y C- es el control negativo

Los productos de amplificación de estos aislamientos fueron digeridos por separado con las enzimas de restricción que aparecen *SwaI*, *MwoI* y *PsiI*. Estas enzimas fueron seleccionadas con productos de amplificación por PCR en cinco muestras para la primera región y seis muestras para la segunda región. Cada digestión fue realizada por triplicado para verificar la reproducibilidad del perfil de bandas. (Figuras 9 y 10).



**Figura 9.** Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para la visualización de los productos de la digestión de región intergénica *rns-nad3* con *SwaI* (izquierda) y *MwoI* (derecha)



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa al 2.5% para la visualización de los productos de la digestión de región intergénica *trmG-rns* con *PstI*

En el caso de éstos productos de amplificación por PCR-RFLP que fueron evaluados en una matriz binaria (ver anexo 1), los resultados del AMOVA arrojaron un valor de PhiPT de 0.002, lo cual confirma que no hay diferenciación genética entre las poblaciones de *P. cinnamomi* de Antioquia (Tabla 9). Este hallazgo corrobora los resultados obtenidos con las secuencias de la región ITS. Es decir, un marcador mitocondrial y un marcador nuclear coinciden en demostrar que las poblaciones del fitopatógeno de Antioquia no se encuentran genéticamente diferenciadas. Adicionalmente, el valor de PhiPT encontrado en este último análisis fue muy bajo, lo cual también podría ser atribuible a la clonalidad de la especie en nuestro país.

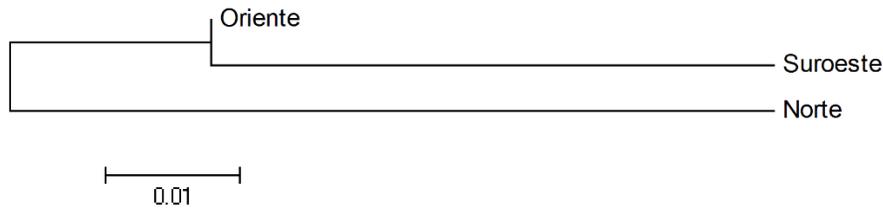
**Tabla 9.** Análisis de Varianza Molecular realizado en 112 aislamientos de *P. cinnamomi* del departamento de Antioquia

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Varianza estadística	%
Entre subregiones	2	1.470	0.735	0.001	0%
Dentro de las subregiones	109	75.843	0.696	0.696	100%
Total	111	77.313		0.697	100%
Índice de Fijación		<b>PhiPT = 0.002</b>	<b><math>p &gt; 0.005</math></b>		

Por otro lado, los valores de las distancias pareadas de Nei analizadas entre parejas de subregiones de Antioquia, demostraron que la población del Altiplano Norte es la más diferente de las poblaciones evaluadas, la de Oriente es más parecida a la de Suroeste que a la del Altiplano Norte; mientras que esta última es muy diferente a la de Suroeste (Figura 11)

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---



**Figura 11.** Árbol de *Neighbor Joining* obtenido con los valores pareados de la distancia de Nei

Teniendo en cuenta la reproducción clonal predominante de *P. cinnamomi* en Antioquia, se calculó la fracción clonal (FC) de cada población (Linde et al. 1999a):

$$FC = \frac{N - C}{N}$$

Donde N es el tamaño de la muestra y C es el número de genotipos distintos en cada población, teniendo en cuenta que para cada aislamiento se generó un genotipo *multilocus* de PCR-RFLP, basado en la presencia de un perfil de bandas con cada enzima de restricción. Los aislamientos con el mismo genotipo fueron considerados clonales (Tabla 10).

De igual manera se calculó la diversidad genotípica (G) (Stoddard & Taylor, 1988):

$$G = \frac{1}{\sum P_i^2} \quad P_i = n_i/N$$

Donde  $P_i$  es la frecuencia observada del  $i^{th}$  genotipo,  $n_i$  es el número de individuos con el genotipo, y N el tamaño de la población (Tabla 10).

**Tabla 10.** Clonalidad y diversidad genotípica de las poblaciones de *P. cinnamomi* analizados en Antioquia por PCR-RFLP: Oriente (Pop1 N=62), Suroeste (Pop2 N=44) y Altiplano Norte (Pop3 N=6) y Antioquia (N=112).

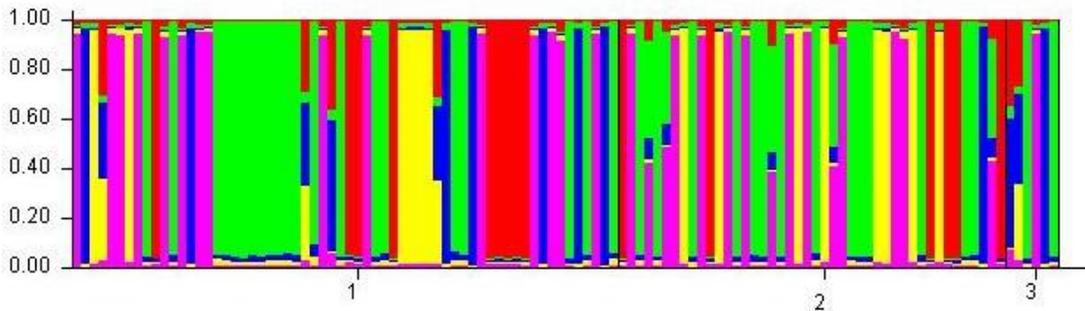
#	SwaI	MwoI	PsiI	GENOTIPO	GENOTIPOS	GENOTIPOS	GENOTIPOS	Genotipos Antioquia
					Pop1	Pop2	Pop3	
1	0	0	0	000	9	6	0	15
2	0	0	1	001	15	10	1	26
3	0	1	1	011	6	8	0	14
4	1	1	1	111	21	14	2	37
5	1	1	0	110	7	1	1	9
6	1	0	0	100	1	0	1	2
7	0	1	0	010	3	0	1	4
8	1	0	1	101	0	5	0	5

<b>Porcentaje de clonalidad (FC*100%)</b>	88.7%	86.3%	16.7%	92.8%
<b>Diversidad genotípica (G)</b>	4.56	4.88	4.50	2.34
<b>G/N (%)</b>	7.35%	11.09%	75%	2.09%

La clonalidad de las poblaciones produjo valores superiores al 80%, indicando que el 80% de los aislamientos se reproducen de manera clonal. La población 3 que representa el Altiplano Norte de Antioquia fue la excepción dado que genero un valor de 16.7% el cual podría estar influenciado por el tamaño de la muestra, ya que solo 6 individuos fueron evaluados en ésta.

**Análisis de agrupamiento Bayesiano**

El análisis de agrupamiento Bayesiano realizado con el software STRUCTURE, indicó un K=5 mediante el valor de máxima verosimilitud más positivo (Ln (P|D)= -103); sin embargo, la varianza de 73.3, igual a la de K=6, llevó a que el *test* ΔK o *test* de Evanno indicara seis *clusters*. Considerando que K=5 presentó la mayor la probabilidad bayesiana y que la varianza fue igual para K=5 y para K=6, y apoyados en que las secuencias de la región ITS de los aislamientos de *P. cinnamomi* para el departamento de Antioquia se distribuyeron en cinco 5 haplotipos, se concluyó que con este marcador la población de *P. cinnamomi* en Antioquia está representada por cinco sub-poblaciones o *clusters* (k=5) (Figura 12) (Tabla 11).



**Figura 12.** Análisis de agrupamiento bayesiano realizado mediante el *software* STRUCTURE, para *P. cinnamomi* procedente de Antioquia. Los colores representan los diferentes *clusters* o grupos obtenidos entre las tres sub-regiones evaluadas.

**Tabla 11.** *Test* de Evanno realizado con todos los individuos de *P. cinnamomi* para determinar el número de *clusters* (K). LnP = función de verosimilitud, Var = varianza;  $L'k = L(k)_n - L(k)_{n-1}$ ;  $L''(k) = L'(k)_n - L'(k)_{n-1}$ ; Delta k =  $[L''(k)]/\text{desv stand.}$

<b>K</b>	<b>Ln P(D)</b>	<b>Var [LnP(D)]</b>	<b>δ [LnP(D)]</b>	<b>L'k</b>	<b>L''k</b>	<b>[L''k]*-1</b>	<b>DeltaK</b>
<b>1</b>	-440.4	1.6	1.26				

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

<b>2</b>	-262.9	50.9	7.13	49.3	-18.9	18.9	2.65
<b>3</b>	-222.9	81.3	9.02	30.4	-45.5	45.5	5.05
<b>4</b>	-145.1	66.2	8.14	-15.1	22.2	22.2	2.73
<b>5</b>	-103	73.3	8.56	7.1	-7.1	7.1	0.83
<b>6</b>	-105.9	73.3	8.56	0	57.4	57.4	6.7
<b>7</b>	-128.7	130.7	11.43	57.4	-34.2	34.2	2.99
<b>8</b>	-144.8	153.9	12.40	23.2	17.3	17.3	1.39
<b>9</b>	-171.3	194.4	13.94	40.5	37.6	37.6	2.7
<b>10</b>	-216	272.5	16.51	78.1	-78.1	78.1	4.73

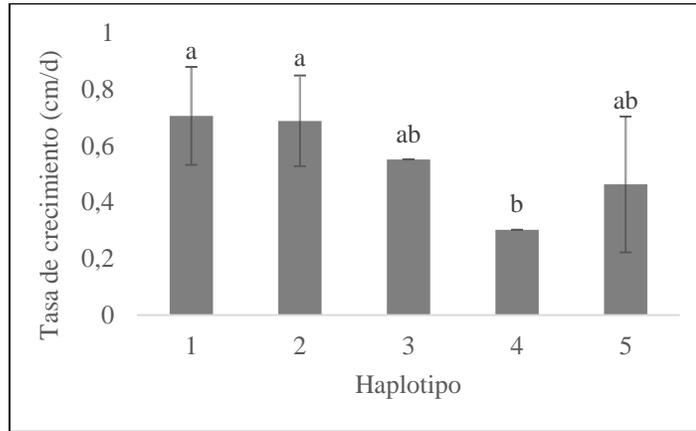
**F. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS CULTURALES Y MOLECULARES DE AISLAMIENTOS DE *P. cinnamomi* DE ANTIOQUIA**

Para evaluar esta relación, se realizaron dos análisis de varianzas para determinar el efecto de las diferencias de crecimiento del fitopatógeno y de su tamaño en condiciones de laboratorio teniendo en cuenta los diferentes haplotipos y los genotipos de los productos de amplificación PCR-RFLP encontrados en este estudio. Estos análisis demostraron que el fitopatógeno difiere en las tasas de crecimiento y en su tamaño cuando se evaluaron los diferentes haplotipos; ya que los valores *p* encontrados en los dos análisis fueron significativos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento y en el tamaño de *P. cinnamomi* entre los distintos genotipos obtenidos los productos de amplificación PCR-RFLP (Tablas 12 y 13). Estos resultados se corroboraron con una prueba de Duncan que indicó que existen diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los aislamientos asociados a los haplotipos 1 y 2 respecto al haplotipo 4 (Figuras 13 y 14). El genotipo de la PCR-RFLP y la interacción Haplotipo x PCR-RFLP, por lo tanto, no parecen tener efecto significativo sobre esta característica.

**Tabla 12.** Análisis de Varianza para el efecto del haplotipo y los productos de PCR-RFLP sobre la velocidad promedio de crecimiento de las colonias de *P. cinnamomi*

<b>Fuente</b>	<b>gl</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Media de cuadrados</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
Haplotipo	4	0.2816	0.07039	2.534	<b>0.0455</b>
PCR-RFLP	7	0.1722	0.02461	0.886	0.5211

H x G	7	0.1942	0.02775	0.999	0.4374
<b>Residuos</b>	91	2.5280	0.02778		



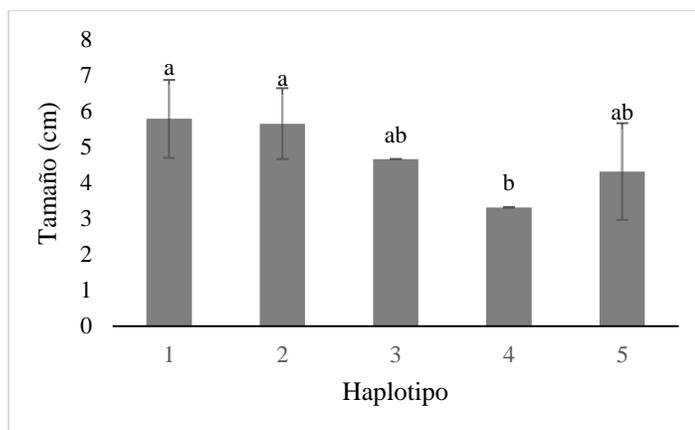
**Figura 13.** Efecto del haplotipo sobre el crecimiento de las colonias (Prueba de rangos múltiples de Duncan.  $\alpha=0.05$ )

**Tabla 13.** Análisis de Varianza para el efecto del haplotipo y el PCR-RFLP sobre el tamaño de las colonias de *P. cinnamomi*

Fuente	gl	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	Valor F	Valor P
Haplotipo	4	10.77	2.69	2.512	<b>0.0471</b>
PCR-RFLP	7	6.97	0.99	0.929	0.4881
H x G	7	6.31	0.90	0.841	0.5560
<b>Residuos</b>	91	97.51	1.07		

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---



**Figura 14.** Efecto del haplotipo sobre el tamaño de las colonias (Prueba de rangos múltiples de Duncan.  $\alpha=0.05$ )

Adicionalmente, dado que los rasgos cuantitativos como lo son: el tamaño de las colonias o la velocidad de crecimiento están controlados por genes cuantitativos, se evaluó el estimador  $Q_{ST}$  (Tabla 14), que relaciona el valor cuantitativo de cualquier carácter teniendo en cuenta la varianza entre las poblaciones estudiadas (A y B) y la varianza dentro de éstas (A independiente de B) así:

$$Q_{ST} = \frac{\delta_g^2(\text{entre})}{\delta_g^2(\text{entre}) + 2\delta_g^2(\text{dentro})}$$

**Tabla 14.** Comparación entre los estimadores  $F_{ST}$  (caracteres moleculares) y  $Q_{ST}$  (caracteres cuantitativos) de las poblaciones de *P. cinnamomi* de Antioquia

RELACIÓN	$Q_{ST}$ CON RESPECTO AL TAMAÑO DE LAS COLONIAS	$Q_{ST}$ CON RESPECTO A LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS	$F_{ST}$
Haplotipo	0.1960	0.2080	
Genotipo de PCR-RFLP	0.0615	0.0714	
Condición fitosanitaria	0.2105	0.2134	Secuencias $F_{ST} = -0.0119$
Subregión de origen	0.1111	0.1115	PCR-RFLP $F_{ST} = 0.002$
Cultivar de origen	0.2519	0.2562	
Morfología de colonia	0.1337	0.1398	

En general, los resultados obtenidos con los  $Q_{ST}$  mostraron ser superiores a los valores de  $F_{ST}$  (hallados en este trabajo) demostrando que la selección natural actúa sobre los fenotipos de este fitopatógeno de tal forma que genera una presión direccional. Esto se confirma por los resultados presentados en las tasas de crecimiento y tamaño de la colonia entre los distintos haplotipos encontrados para *P. cinnamomi* (Tablas 13 y 14). Esto no ocurrió así para los genotipos hallados por las PCR-RFLP pues los valores de  $Q_{ST}$  fueron similares a los valores de  $F_{ST}$ .

Finalmente, debido a que los análisis de varianza solo se pueden hacer sobre datos cuantitativos, es decir, en datos relacionados con la velocidad de crecimiento y el tamaño de la colonia del fitopatógeno, se realizaron análisis posteriores de ji-Cuadrado de Pearson sobre los datos categóricos considerados en este estudio: haplotipo (5 haplotipos), genotipo generado por la PCR-RFLP (8 genotipos de datos binarios) y la morfología (3 morfologías: roseta, estrella y sin patrón); para evaluar el efecto de la subregión de origen, el cultivar y el estado fitosanitario de los hospederos sobre estas tres variables mencionadas. Estos análisis no generaron valores  $p$  significativos por lo que ni la morfología, ni el haplotipo, ni el genotipo de PCR-RFLP del fitopatógeno presentaron algún tipo de asociación con la subregión de origen o las características del hospedero (cultivar o condición fitosanitaria) (Tabla 15).

**Tabla 15.** Prueba ji-Cuadrado de Pearson para evaluar el efecto de la subregión de origen, el cultivar y el estado fitosanitario de los hospederos sobre el haplotipo, el genotipo generado por la PCR-RFLP y la morfología (corrección de Bonferroni =  $\alpha = 0.05/11 = 0.0045$ )

COMPARACIÓN	Chi cuadrado	GL	VALOR P
Morfología vs Subregión	3.02	4	0.55
Haplotipo vs Subregión	5.80	8	0.67
PCR-RFLP vs Subregión	19.75	14	0.14
Morfología vs Cultivar	0.85	2	0.65
Haplotipo vs Cultivar	0.59	4	0.96
PCR-RFLP vs Cultivar	4.57	7	0.71
Morfología vs Estado del Árbol	0.06	2	0.97
Haplotipo vs Estado del Árbol	7.02	4	0.13
PCR-RFLP vs Estado del Árbol	6.17	7	0.52
Morfología vs Haplotipo	8.04	8	0.43

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

---

<b>Morfología vs PCR- RFLP</b>	10.64	14	0.71
------------------------------------	-------	----	------

---

## 8. Discusión

### A. ESTABLECIMIENTO DE UNA COLECCIÓN DE *P. cinnamomi*

La colección de *P. cinnamomi* fue establecida de muestras obtenidas en 664 árboles de aguacate de los cuales se obtuvieron 151 aislamientos de *P. cinnamomi*. Los 151 aislamientos corresponden al 22.74% de las muestras analizadas y estas muestras de *P. cinnamomi* fueron identificadas morfológica y molecularmente por secuenciación directa de la región ITS del ADN ribosomal. El 64.2% de los aislamientos de este fitopatógeno procede la subregión Oriente. Esta región contiene la mayor área sembrada de aguacate del departamento. El 31.8% de los aislamientos se obtuvieron del Suroeste y el 4% de éstos en el Altiplano Norte. El 69.5% de los aislamientos fueron aislados de árboles sin sintomatología y el 30.5% de árboles con sintomatología. El 94% de los aislamientos se obtuvieron de árboles de cultivares comerciales (con manejo agronómico) y el 6% de cultivares criollos (sin manejo agronómico). Estos porcentajes no reflejan la incidencia del fitopatógeno en el departamento, puesto que las colectas fueron realizadas en el marco de un proyecto del Sistema General de Regalías que busca evaluar varios aspectos agrobiológicos que inciden en los cultivos de aguacate de Antioquia. No obstante, estos datos resaltan la necesidad de una detección oportuna de este fitopatógeno antes de su establecimiento en el cultivo.

Este trabajo constituye la primera colección de aislamientos de *P. cinnamomi* registrada ante las autoridades competentes en Colombia quedando a disposición de la comunidad académica para su estudio. *World Phytophthora Collection* (WPC, 2016) resalta la importancia de contar con estas colecciones “como fundamentos esenciales para la seguridad agrícola mediante el apoyo al trabajo forense, la gestión de enfermedades y de las medidas regulatorias”. Así mismo contar con esta colección permitirá extender los estudios sobre el fitopatógeno a nivel nacional e internacional. Especialmente esta colección es útil para los investigadores interesados en la realización de estudios de la genómica del fitopatógeno y análisis posteriores de diversidad genética y fenotípica y de variación entre poblaciones de la especie y entre especies del género *Phytophthora* (<http://phytophthora.ucr.edu/database.html>). Otros investigadores en diferentes países como Estados Unidos y Australia han usado accesiones de las colecciones de éste fitopatógeno pre-existentes para la caracterización molecular, identificación de poblaciones con sistemas de apareamiento A1 y A2 y estudios sobre la genética de sus poblaciones (Linde et al. 1997; Linde et al. 1999a; Wilkinson et al. 2001; Martin & Coffey, 2012).

## B. ANÁLISIS FENOTÍPICO

Los análisis fenotípicos realizados en las colonias de los 112 aislamientos de *P. cinnamomi* en condiciones de laboratorio exhibieron resultados acordes a los obtenidos por otros autores. En el caso de la morfología se observaron colonias con formas de roseta, estrella o sin patrón. Estos tipos de morfologías han sido previamente descritas en aislamientos del fitopatógeno en diferentes especies de *Eucalyptus* cuando el fitopatógeno fue inoculado en medio PDA. En estos trabajos se encontró que la forma más común era la roseta (Hüberli et al. 2001; Eggers et al. 2012). De la misma manera, la forma más común del fitopatógeno hallada en este estudio fue la forma roseta. Sin embargo, es importante tener en cuenta que es posible que algunos de los aislamientos encontrados en este trabajo hayan mostrado patrones ligeramente diferentes en alguna de las repeticiones, así también lo registraron Hüberli y colaboradores (2001). Esto permite concluir que la forma de la colonia no es un carácter estable y debe ser usado con precaución para la identificación de esta especie.

Con respecto al diámetro y a la tasa de crecimiento de las colonias, se observaron diferencias significativas entre los aislamientos del fitopatógeno. Este tipo de diferencias (en la velocidad de crecimiento y tamaño de las colonias) generaron unos rangos similares a los reportados en trabajos realizados por Linde y colaboradores (1999b), quienes analizaron el diámetro de las colonias de *P. cinnamomi* en 99 aislamientos. Estos aislamientos fueron sembrados en medio PDA e incubados a 25°C por 72 h, y produjeron tamaños de colonia entre 19.9 mm y 45.5 mm. En el presente estudio, al cabo de 72 h, los tamaños de colonia estuvieron entre 20.2 y 40.3 mm a una temperatura de 20°C.

Linde y colaboradores (1999b) además, reportaron una correlación significativa entre la tasa de crecimiento *in vitro* de los aislamientos y su nivel de patogenicidad, sugiriendo que los aislamientos con rápido crecimiento podrían ser seleccionados para ensayos de resistencia, eliminando la necesidad de inocular árboles para determinar los niveles de patogenicidad. No obstante, esto no se puede evidenciar en los aislamientos de *P. cinnamomi* de Antioquia, los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de crecimiento entre los aislamientos que provenían de árboles que aún no presentaban la sintomatología de la enfermedad y los árboles que ya se observaban enfermos. Los aislamientos de los árboles sin sintomatología mostraron mayores tasas de crecimiento de colonia y diámetros de mayor tamaño. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que, cuando un árbol infectado por el fitopatógeno manifiesta síntomas en su parte aérea, es

probable que se deba a que la necrosis radicular se encuentra muy avanzada, imposibilitándole a la planta absorber agua y nutrientes. Dado que este fitopatógeno es hemibiótrofo, cuando el tejido está muy necrosado, éste pasa a un estado de latencia o saprofítico en el que su crecimiento decae. Mientras que en un árbol que no presenta sintomatología, es posible que el fitopatógeno hasta ahora esté colonizando las raíces sanas de la planta, por lo que se encuentra en un crecimiento más activo (García et al. 2010). Hüberli y colaboradores (2001), tampoco encontraron una relación significativa entre la tasa de crecimiento y la patogenicidad de *P. cinnamomi* y, al igual que otros estudios, indicaron que existe una dependencia entre el crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi* y la temperatura, agregando además, una afectación por la composición del medio de cultivo en el que se evalúe (Zentmyer et al. 1976). Por lo tanto, es necesario incluir análisis con diferentes temperaturas y medios de cultivo y realizar otros estudios sobre la tasa de crecimiento como predictor de la patogenicidad de un aislamiento; además, deben estudiarse marcadores genéticos asociados directamente a genes de patogenicidad y la producción de metabolitos asociados a la enfermedad. Todo esto disminuiría la inversión de tiempo y dinero en los programas de búsqueda de resistencia en aguacate y en otros hospederos a *P. cinnamomi*.

Eggers y colaboradores (2012), por su parte, analizaron las tasas de crecimiento en un medio de cultivos cV8A de colonias de aislamientos de *P. cinnamomi* de eucalipto procedente de las regiones del Norte y el Sur del Atlántico Medio de Estados Unidos después de 48 h a 20°C. Las colonias con forma de roseta presentaron tasas de crecimiento promedio significativamente mayores que las colonias con forma de estrella, con  $17.6 \pm 3.8$  mm/d y  $15.7 \pm 3.2$  mm/d respectivamente. Los aislamientos obtenidos de cultivos de aguacate de Antioquia, presentaron diferencias similares entre las tasas de crecimiento promedio de las colonias con morfología en roseta y las de estrella cuando se desarrollaron en medio PDA, aunque estas fueron notablemente mayores a las reportadas en cV8A en el mismo tiempo, con  $23.04 \pm 0.25$  mm/d en las primeras y  $19.14 \pm 0.21$  mm/d en las segundas; indicando además que es posible que *P. cinnamomi* crezca mejor en medio de cultivo PDA que en medio cV8A. Hüberli y colaboradores (2001) señalan que los aislamientos de *P. cinnamomi* presentaron menores tasas de crecimiento a 20°C, que a 24°C o 28°C; por lo que sería pertinente probar otras temperaturas en posteriores estudios para evaluar el crecimiento de este fitopatógeno y determinar si presenta plasticidad fenotípica.

Por otro lado, los resultados relacionados con las pruebas de ANOVA en las que se evaluaron las interacciones entre las características morfológicas de los aislados de *P. cinnamomi*, con otros

factores como la subregión de origen (Altiplano Norte, Suroeste y Oriente) y el cultivar (comercial vs criollo) de aguacate del que provienen los aislamientos, no fueron significativas. Esto podría indicar que la población de *P. cinnamomi* en Antioquia, no ha sufrido una presión de selección por las diferentes condiciones agroclimáticas en las que están los cultivos de aguacate en el departamento; tampoco por el manejo agronómico al cual no están enfrentados los provenientes de cultivares criollos. Es conveniente que en futuras investigaciones se realicen pruebas de sensibilidad de este fitopatógeno a los fungicidas aplicados tradicionalmente para el manejo de pudriciones radiculares, que permitan confirmar si existen diferencias entre los aislamientos de *P. cinnamomi* que han estado sometidos a estos productos, y si esto tiene otros efectos a nivel fenotípico y genético.

Mbaka y colaboradores (2010) explican que las variaciones en una población pueden elevar el potencial para que un fitopatógeno sobreviva ante condiciones adversas y por lo tanto para que resista medidas de control. Una variación alta indica potencial para evolucionar y adaptarse al ambiente.

La variación fenotípica respecto a la forma, diámetro y tasa de crecimiento de las colonias de *P. cinnamomi* encontrada en este y otros trabajos, han hecho suponer la existencia de una alta variabilidad genética en la especie (Dobrowolski, 1999). Contrariamente, diversos estudios genéticos sobre las poblaciones de *P. cinnamomi* de países como Sur África, Australia y Estados Unidos han evidenciado bajos niveles de diversidad genotípica y una reproducción principalmente clonal, por lo que la diversidad a nivel morfológico ha sido dada bajo reproducción asexual (Linde et al. 1999b; Hüberli et al. 2001). La variación fenotípica entonces, podría explicarse por un efecto de la plasticidad fenotípica del fitopatógeno bajo diferentes ambientes, ya que ésta ocurre cuando una especie exhibe diferentes fenotipos o respuestas a diferentes presiones de selección presentando un mismo genotipo (Hartl & Clark, 1997). Un trabajo hecho por Britt y Hansen (2009) sobre el efecto de los cambios de la temperatura y diferentes medios de cultivo en poblaciones de *Phytophthora ramorum* proveniente de los bosques de Oregón en condiciones de laboratorio, demostró que la morfología de las colonias, la producción de clamidosporas y el crecimiento de las colonias varió al modificar estos dos componentes, aun cuando los cuarenta aislamientos evaluados presentaban el mismo genotipo. Esta especie fue genotipificada con 45 microsatélites de los cuales escogieron 8 genotipos idénticos que fueron sometidos a cinco temperaturas diferentes y dos medios de cultivo distintos (con bajo y alto contenido nutricional). Este tipo de experimentos son fundamentales para

ser realizados en *P. cinnamomi* ya que podrían explicar la causa por la cual la especie está distribuida en una gran cantidad de hospederos y su alta capacidad de infección.

**C. ANÁLISIS DE LA GENÉTICA DE POBLACIONES A PARTIR DE SECUENCIAS DE LA REGIÓN ITS DEL ADN<sub>r</sub> Y UNA PCR-RFPL DE LAS REGIONES INTERGÉNICAS *trnG-rns* Y *rns-nad3* del ADN MITOCONDRIAL.**

En esta investigación, también se analizó la diferenciación genética de los aislamientos de *P. cinnamomi* obtenidos de cultivos de aguacate en Antioquia por medio de una secuenciación directa de la región ITS del ADN ribosomal y la amplificación y digestión enzimática de las regiones intergénicas *trnG-rns* y *rns-nad3* del ADN mitocondrial.

En la genética de poblaciones, los estimadores  $F_{st}$  se utilizan para evaluar la diferenciación genética existente entre poblaciones que son diploides y con reproducción sexual, en el caso de que una especie tenga una naturaleza clonal estos estimadores pueden generar valores de  $F_{st} = 0$  o negativos (un valor negativo de  $F_{st}$  es equivalente a cero) ya que la heterocigosidad encontrada en una población clonal debe ser cero. Este argumento fue utilizado por Lambertini et al. (2010) en *Elodea canadensis*, *Egeria densa* y *Lagarosiphon major*, tres especies invasivas de plantas clonales de Nueva Zelanda en las que encontraron valores de  $F_{st}$  de -0.02, -0.5 y -0.25 en poblaciones Tikitapu, Rotoaira y Kaituna respectivamente con el uso de marcadores AFLP (Lambertini et al. 2010). Lo anterior apoya los resultados encontrados en este trabajo en los que se encontró un valor negativo de  $F_{st}$  indicando que no hay diferenciación genética significativa entre las sub-poblaciones de *P. cinnamomi* de cultivos de aguacate en Antioquia. Sin embargo, es conveniente probar la clonalidad con otro marcador nuclear.

El cálculo del porcentaje de clonalidad de la especie confirmó la predominancia de reproducción asexual en este departamento de Colombia, puesto que la región Oriente ( $N = 62$ ) presentó un 88.7% de clonalidad, seguido del Suroeste con 86.3 % ( $N= 44$ ) y el Altiplano Norte con 16.7% ( $N=6$ ). El bajo porcentaje de clonalidad que presentó esta última región pudo deberse al bajo número de individuos analizados. Valores de clonalidad más bajos en *P. cinnamomi* fueron reportados por Linde y colaboradores (1999a) en poblaciones del fitopatógeno de Sur África y Australia con porcentajes de clonalidad de 60.3 y 60.5%. Mientras que en Papua Nueva Guinea la clonalidad fue del 0%. Estos resultados los atribuyen al hecho de que en este último país se ha ubicado el centro de origen de la especie, dado que presenta una alta variabilidad genética y los dos tipos de apareamiento,

A1 y A2; además muchas especies vegetales no son susceptibles al fitopatógeno (Pagliaccia et al. 2013). Los resultados obtenidos para Antioquia demuestran que la especie presenta un mayor porcentaje de clonalidad al reportado por Linde y colaboradores (1999a) en Sur África y Australia esto quizás se deba a que ellos usaron varios hospederos para obtener muestras de *P. cinnamomi*, entre ellos: eucalipto, pino, aguacate, y de diversas localidades en ambos países alejadas geográficamente. En este estudio las colectas solo se realizaron en aguacate y en un solo departamento del país, por lo que la variabilidad genética es menor por el efecto del muestreo (deriva).

Otra posibilidad para explicar la falta de variabilidad genética de *P. cinnamomi* en Antioquia puede deberse a que la especie pudo haber sufrido un cuello de botella al llegar al país que redujo su variabilidad genética. No obstante, los análisis del test D de Tajima mostraron que las poblaciones del fitopatógeno evaluadas en Antioquia no han pasado por procesos de expansión, ni contracción recientes, sino que la especie ha permanecido de tamaño constante. Esta baja diferenciación podría ser más fácilmente explicada por la clonalidad de la especie, ya que una especie clonal solo tiene como fuente de variación genética las mutaciones. Varias investigaciones han argumentado otra causa de variabilidad genética en *P. cinnamomi*, refiriéndose a la posibilidad de que la especie sufra de recombinación mitótica (Goodwin, 1997; Schreier, 2013). Sin embargo, hasta el momento no se han encontrado los marcadores moleculares ideales para demostrar este tipo de recombinación. Goodwin (1997) argumenta que la mayor parte de la variación genética de *P. cinnamomi* no involucra la formación de nuevos alelos como ocurre por efectos de las mutaciones, sino que se producen nuevos homocigotos que surgen de genes heterocigotos. Un entrecruzamiento durante la mitosis en *loci* que se encuentran en el mismo cromosoma de dos individuos parentales, podría producir un homocigoto a partir de un heterocigoto en *loci* que se encuentren distales (alejados) del punto físico donde ocurre la recombinación. Este autor ha mostrado datos de variación en composición de aloenzimas en linajes clonales que involucraron la formación de los homocigotos 92/92 a partir de heterocigotos 92/100 en el *locus Pep* en las cepas US6.1 y US6 de *P. cinnamomi* mantenidas en el laboratorio.

Respecto a los análisis de estructuración genética realizados en este trabajo, se produjeron dos análisis de varianza molecular o AMOVA para las secuencias del gen ITS y para los productos de amplificación de la PCR-RFLP de las regiones intergénicas del ADN mitocondrial de *P. cinnamomi*.

Ambos análisis produjeron bajos valores de  $F_{ST} = -0.0119$  y  $0.002$ . Estos valores demuestran que las poblaciones de la especie evaluadas en Antioquia (Oriente, Suroeste y Altiplano Norte) no presentan diferenciación genética, ya que los valores del  $F_{ST}$  no fueron significativos. Estos resultados podrían explicarse por la clonalidad del fitopatógeno y por la proximidad geográfica de las regiones analizadas en este departamento de Colombia (Schreirer, 2013), ya que cuando se generó un AMOVA con datos de secuencias de *P. cinnamomi* obtenidas del Genbank de diferentes países y diferentes hospederos se encontró un valor de  $F_{ST} = 0.45$  significativo, indicando que la especie se encuentra genéticamente estructurada a nivel mundial, aunque esta diferenciación probablemente se deba a un aislamiento por distancia (Hartl & Clark, 1997). Resultados similares fueron encontrados por Pagliaccia y colaboradores (2013) en un trabajo en el que los autores utilizaron AFLP para genotipificar poblaciones del fitopatógeno del Norte y Sur de California con aislamientos obtenidos de 2009 a 2010 en huertos de aguacate alejados geográficamente e incluyeron colonias con tipos de reproducción A1 y A2 y otros hospederos (piña, uva, pino, azalea, camelia, entre otros). Estos autores utilizaron también muestras del fitopatógeno colectadas de 1989 a 2010 en cultivos de aguacate de las mismas zonas mencionadas y produjeron un dendrograma NJ en el que obtuvieron tres agrupaciones, una de ellas compuesta por muestras de *P. cinnamomi* con el tipo de reproducción A1, otra con muestras del fitopatógeno con tipo de apareamiento A2 pero de colectas realizadas de 1989 a 2010 y de otros hospederos y, finalmente, un último grupo conformado por muestras colectadas de 2009 a 2010 con reproducción A2. Ellos argumentan que este dendrograma claramente separa las poblaciones del fitopatógeno dado su tipo de reproducción, pero además señalan que las muestras se separaron genéticamente por los periodos de colecta 1989 a 2010 vs 2009 a 2010; siendo las muestras colectadas de 2009 a 2010 las de menor variabilidad genética, ya que encontraron menos marcadores AFLP en ellas, por ello concluyen también que éstas últimas muestras fueron recientemente introducidas en California. Estos autores hicieron un análisis bayesiano de poblaciones encontrando un  $K = 2$ , lo que indica que las poblaciones evaluadas están genéticamente subdivididas en 2 subpoblaciones, lo cual correlacionan con los clados A2 identificados por el NJ.

En este trabajo también se realizó un análisis bayesiano de las poblaciones de *P. cinnamomi* muestreadas en el departamento de Antioquia, el cual produjo un valor de  $K = 5$ . Este valor coincide con el número de haplotipos hallado para este departamento, donde los haplotipos 1 y 2 albergaron más del 90% del total de los aislamientos, siendo el H = 2 el más abundante, aunque no se encontraron características comunes entre los aislamientos de los haplotipos según las variables analizadas (morfológicas, origen, características del hospedero), que ayudaran a explicar su

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

agrupamiento. Estos resultados demuestran que convendría evaluar otros factores importantes como el tipo de apareamiento en próximos estudios en la especie y diversas regiones colombianas y hospederos, dado que la mayor divergencia genética ha sido encontrada entre poblaciones de aislamientos A1 y A2, y podría ayudar a explicar la distribución de los haplotipos en Antioquia (Old et al. 1984).

No obstante, es posible que haya una asociación entre los haplotipos de *P. cinnamomi* y sus hospederos, además, entre los haplotipos y algunas variedades del fitopatógeno (Old et al. 1984; Greene et al. 2006). Cuando las secuencias de aislamientos de aguacate de Antioquia fueron comparadas con las de otros países y otros hospederos, disponibles en el GenBank se obtuvieron 16 haplotipos, de los cuales, el haplotipo 1 fue mucho más común que los otros y está ampliamente distribuido a través de los países abarcados en el análisis, incluyendo Colombia; mientras que el 9, solo estuvo presente en aguacate de Colombia, por lo tanto su distribución podría representar una introducción separada del fitopatógeno a través de los movimientos de material vegetal y de suelo. En el caso del haplotipo 1, los resultados obtenidos en este trabajo podrían demostrar que los aislamientos de *P. cinnamomi* de Antioquia de este haplotipo pudieron originarse de otros árboles ornamentales y maderables como roble, castaño, encina, alcornoque y otros reportados como hospederos del fitopatógeno, que poseen rangos de distribución geográfica similares a los de aguacate en países como Italia, España, Sur África, Portugal, Francia, Estados Unidos, China, Japón. Mientras que los aislamientos del fitopatógeno reconocidos en el haplotipo 9 de este estudio, podrían haber sido introducidos únicamente de materiales de aguacate, ya que este haplotipo agrupó secuencias del fitopatógeno encontradas en Antioquia exclusivamente. No obstante, esto no significa que haya una especialización de genotipos particulares a hospederos específicos, aunque Robin y Desprez (1998) plantearon la existencia de “cepas” o “razas” que difieren en su capacidad para inducir síntomas sobre determinados hospederos.

Michael y Coffey (2012) también encontraron asociaciones entre los haplotipos mitocondriales y sus hospederos, dos de los haplotipos encontrados en su trabajo se conformaron con aislamientos recuperados de *Persea americana* en España y Sur África uno y en Hawai y California el otro. Ellos también concluyen que la distribución de material vegetal puede contribuir a la diseminación geográfica del fitopatógeno.

Adicionalmente, cuando las secuencias de Antioquia fueron comparadas con las de otros países y hospederos, se encontró que los haplotipos obtenidos también separaron las tres variedades de *P. cinnamomi* hasta hace poco reconocidas: *P. cinnamomi* var. *cinnamomi*, *P. cinnamomi* var. *robiniae* y *P. cinnamomi* var. *parvispora*; ésta última ha sido reclasificada en los últimos años para ser considerada como una especie separada distinta de *P. cinnamomi*, dadas las diferencias demostradas a nivel genético y morfológico, fue nombrada como *P. parvispora* (Scanu et al. 2014). Aunque la variedad de muchos de las accesiones consideradas es desconocida, aquellas reportadas como *P. cinnamomi* var. *cinnamomi*, se agruparon en el haplotipo 1, junto al 38.5% de las secuencias de Antioquia, las de la variedad *P. cinnamomi* var. *parvispora* se agruparon en el haplotipo 2 y las de *P. cinnamomi* var. *robiniae*, en el haplotipo 12. Esto podría estar indicando que los aislamientos de *P. cinnamomi* del departamento de Antioquia agrupados en el haplotipo 1, pertenecen a la variedad *P. cinnamomi* var. *cinnamomi* y que la región ITS es un *locus* diagnóstico de esta especie a nivel de variedad.

Finalmente, es también importante mencionar que la red haplotípica generada para estas secuencias refleja una clara separación genética de los haplotipos de este fitopatógeno hallados en Antioquia y los haplotipos de otras partes del mundo y hospederos. Esta red apoya los resultados obtenidos en el AMOVA de las secuencias del gen ITS y su respectivo árbol de NJ obtenido con distancias genéticas de  $F_{ST}$  pareados, por lo que un aislamiento por distancia es posible que ocurra en esta especie.

Por otro lado, un trabajo sobre la genética de poblaciones de cultivos de aguacate del departamento de Antioquia realizado por Cañas y colaboradores (2015) con el uso de marcadores AFLP mostró que el cultivo de aguacate de este departamento se encuentra genéticamente diferenciado con un valor de  $F_{ST} = 0.137$  ( $p < 0.001$ ). Esta variación se presentó entre tres regiones agroclimáticamente diferenciadas del cultivo en esta parte del país. Contrariamente, *P. cinnamomi* no está genéticamente diferenciada en este departamento, lo que facilitaría el manejo del fitopatógeno en este cultivo, ya que su reproducción es de tipo clonal, por lo que presentan un mismo genotipo que podría ser controlado más rápidamente que en una especie con reproducción sexual. Sin embargo, esto también podría sugerir que la patogenicidad de esta especie en el cultivo de aguacate se deba a plasticidad fenotípica (Freeland, 2005). Esta plasticidad podría comprobarse en bioensayos del fitopatógeno con diversos fungicidas, por lo que es necesario que en futuros trabajos se secuencie *P. cinnamomi* con el gen ITS previo a la realización de pruebas de resistencia/susceptibilidad a fungicidas en condiciones de laboratorio.

#### **D. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS CULTURALES Y MOLECULARES DE AISLAMIENTOS DE *P. cinnamomi* DE ANTIOQUIA**

Los análisis de varianza realizados para determinar si hay diferencias en el tamaño de las colonias del fitopatógeno y en sus tasas de crecimiento en condiciones de laboratorio dependiendo el haplotipo fueron significativas. Esto indica que diferentes haplotipos varían en su crecimiento y tamaño. Aunque este resultado debe tenerse en cuenta con cautela ya que el haplotipo 4 presentó una tasa de crecimiento y de tamaño significativamente menores que los haplotipos 1 y 2 de la especie, pero su tamaño muestral fue muy bajo, y esto pudo haber sesgado los resultados.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento y en el tamaño de *P. cinnamomi* entre los distintos genotipos obtenidos de los productos de la PCR-RFLP. La interacción Haplotipo x PCR-RFLP por su parte, tampoco fue significativa.

Los resultados obtenidos en este trabajo para la evaluación de la relación entre el genotipo de *P. cinnamomi* y su fenotipo muestran que, en general, la información obtenida de las secuenciaciones es más promisorias para la comparación entre estas dos variables; dado que los haplotipos de este fitopatógeno si variaron en cuanto a su tasa de crecimiento y diámetro debido a que los haplotipos 1 y 2 presentaron mayor tasa de crecimiento y tamaño respecto a los otros haplotipos, aunque estas dos variables solo fueron significativamente diferentes al compararlas con el haplotipo 4.

Por otro lado, debido a que los análisis en genética de poblaciones permiten el uso de caracteres cuantitativos para evaluar si hay estructuración genética entre poblaciones, en este estudio se calcularon diversos valores de  $Q_{ST}$  de los valores de las tasas de crecimiento y tamaño de las colonias respecto a su haplotipo, condición fitosanitaria, subregión, cultivar de origen y morfología de las colonias y se encontró que todos estos valores fueron superiores a los valores de  $F_{ST}$  obtenidos en Antioquia. Los resultados por lo tanto indican que estos dos caracteres morfológicos se encuentran bajo una presión de selección direccional (Freeland, 2005). Esto significa que la selección natural está favoreciendo la formación de poblaciones del fitopatógeno morfológicamente diferenciadas en la naturaleza, donde ésta morfología diferencial está reflejada en la tasa de crecimiento y en el diámetro de la colonia. Respecto a los valores de  $Q_{ST}$  encontrados para los genotipos generados por las PCR-RFLP, éstos valores fueron similares a los valores de  $F_{ST}$ , esto sugiere que para esta variable

la tasa de crecimiento y en el tamaño de la colonia son caracteres selectivamente neutrales (Freeland, 2005).

Finalmente, los resultados obtenidos con las pruebas de ji-Cuadrado de Pearson sobre los datos categóricos de haplotipo (ya que se encontraron 5 haplotipos), genotipo generado por la PCR-RFLP (ya que se encontraron 8 genotipos de datos binarios) y la morfología (dado que se encontraron 3 morfologías: roseta, estrella y sin patrón) para evaluar el efecto de la subregión de origen, el cultivar y el estado fitosanitario de los hospederos sobre estas tres variables mencionadas no fueron significativos, por lo que ninguna de estas tres variables (la morfología, haplotipo, genotipo de PCR-RFLP) del fitopatógeno presentan algún tipo de asociación con la subregión de origen o las características del hospedero (cultivar o condición fitosanitaria).

## 9. Conclusiones

- A. En condiciones de laboratorio, las colonias de los aislamientos de *P. cinnamomi* presentaron tres morfologías: roseta, la más abundante, estrella y sin patrón; con tasas de crecimiento entre 0.293 y 1.126 cm/d y diámetros de 3.31 a 7.97 cm.
- B. El análisis de secuencias de la región ITS del ADN ribosomal sobre 109 aislamientos de *P. cinnamomi* de Antioquia, indicó que el fitopatógeno tiene una baja diferenciación genética en el departamento. Además, los resultados sugieren que en esta zona, la especie no presenta recombinación sexual.
- C. El análisis de secuencias además agrupó los aislamientos en cinco haplotipos, de los cuales el haplotipo 2 fue el más abundante, conteniendo el 56.9% de las secuencias, mientras que el haplotipo 1 contenía el 38.5%. Sin embargo, no se encontraron características comunes adicionales dentro de las variables evaluadas como: morfología, origen geográfico (Altiplano Norte, Suroeste y Oriente) o características del hospedero (cultivar, estado fitosanitario).
- D. El análisis del ADN mitocondrial por PCR-RFLP de las regiones intergénicas *trnG-rns* y *rns-nad3*, validó los hallazgos obtenidos con el análisis de las secuencias, indicando que *P. cinnamomi* presenta un porcentaje de clonalidad del 80% en las regiones Oriente y Suroeste y del 16% en la región Norte. El análisis de secuencias de *P. cinnamomi* de todo el mundo, incluyendo al departamento de Antioquia, indicó que a nivel mundial el fitopatógeno si presenta estructuración poblacional, la cual puede ser explicada principalmente por el aislamiento geográfico. Además, el análisis arrojó 16 haplotipos, de los cuales los haplotipos 1 y 9 fueron los más frecuentes. El H1 incluyó secuencias de Colombia, Sur África, Estados Unidos, España y Portugal; mientras que el H9 solo contenía secuencias de aislamientos de Colombia. Se presume que los haplotipos encontrados se formaron como consecuencia de la introducción de material vegetal, sea de aguacate o de otros hospederos al departamento en dos momentos diferentes de la historia del cultivo.
- E. Las variables que tuvieron mayor efecto sobre las tasas de crecimiento y diámetro de las colonias en el laboratorio fueron: la morfología, para la que la forma en roseta y las colonias sin patrón, presentaron tasas de crecimiento significativamente mayores con respecto a la forma en estrella; el estado fitosanitario del árbol, para el que se obtuvo que los aislamientos

provenientes de árboles sin sintomatología de la enfermedad presentaron las mayores tasas de crecimiento con respecto a árboles enfermos. De igual manera, los haplotipos influyeron sobre las tasas de crecimiento y el diámetro de las colonias, siendo significativamente mayores en los haplotipo 1 y 2 con respecto al 4.

- F. La baja diferenciación genética de *P. cinnamomi* de Antioquia determinada en este estudio, en contraste con la diversidad encontrada en aguacate, sirven como base para futuros programas de control de las pudriciones radiculares causadas por este fitopatógeno, no solo en la búsqueda de materiales resistentes, sino también en el uso efectivo de fungicidas. No obstante, debe profundizarse en los estudios de plasticidad fenotípica en esta especie

## 10. Perspectivas y Recomendaciones

- A. La colección de *P. cinnamomi* establecida, debe ser nutrida con aislamientos de otras zonas productoras de aguacate del país e incluso de Latinoamérica, de manera que sirvan como insumo para futuros estudios a nivel fenotípico y genético sobre el fitopatógeno en la región.
- B. Se deben estudiar otros rasgos fenotípicos característicos de *P. cinnamomi* como el tamaño y la forma de los zoosporangios, los tipos de apareamiento, la temperatura óptima de crecimiento, la patogenicidad, la sensibilidad a fungicidas y todo lo que ayude a entender mejor el microorganismo.
- C. Sería recomendable que los próximos estudios sobre *P. cinnamomi* sean dirigidos también a otros hospederos, dado el amplio rango de especies de plantas en las que se ha encontrado el fitopatógeno.
- D. Adicionalmente, la plasticidad fenotípica en especies del género *Phytophthora*, como *P. ramorum* ya ha sido reportada. Se deben adelantar mayores estudios que permitan determinar si ésta característica está presente también en *P. cinnamomi* y cómo esta ha favorecido la amplia distribución alcanzada por este fitopatógeno en el mundo y su creciente rango de hospederos.
- E. Por otro lado, es recomendable realizar estudios genéticos adicionales en poblaciones de *P. cinnamomi* en los que se incluyan otros marcadores moleculares, específicamente relacionados con la patogenicidad y la sensibilidad a fungicidas y que ayuden a entender mejor el tipo de reproducción predominante.

# 11. Bibliografía

Acosta I. 2008. Pruebas de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. en plántulas de aguacate criollo Mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). Tesis Profesional no publicada, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.

Agro progreso S. A. S. 2015. Proceso de Exportación Agro Progreso S. A. S. Recuperado el 13 de febrero de 2017 de: <https://es.slideshare.net/AGROPROGRESOSAS/proceso-de-exportacion-de-aguacate-hass>

Akinsanmi O. & Drenth A. 2013. Phosphite and metalaxyl rejuvenate macadamia trees in decline caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Crop Protection*, 53: 29-36.

Alcaraz M. & Hormaza J. 2011. Influence of physical distance between cultivars on yield, outcrossing rate and selective fruit drop in avocado (*Persea americana*, Lauraceae). *Annals of Applied Biology*, 158: 354-361.

Alexopolus C., Mims C. & Blackwell M. 1996. Introductory mycology. Fourth Edition. 868p.

Aryantha I. & Guest D. 2006. Mycoparasitic and Antagonistic Inhibition on *Phytophthora cinnamomi* Rands by Microbial Agents Isolated from Manure Composts. *Plant Pathology Journal*, 5: 291-298.

Blair J., Coffey M., Park S., Geiser D. & Kang S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 266-277.

Boccas B. & Zentmyer G. 1976. Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *P. parasitica*. *Phytopathology*, 66: 477-484.

Britt J. & Hansen E. 2009. Phenotypic plasticity, fitness and multilocus genotypes of *Phytophthora ramorum* populations in southern Oregon tanoak forests. *Phytopathology*, 99: S16.

Burgess T., Scott J., Mcdougall K., Stukely M., Crane C., Dunstan W. ... Hardy G. 2016. Current and projected global distribution of *Phytophthora cinnamomi*, one of the world's worst plant pathogens. *Global Change Biology*. 23(4): 1661-1674.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

Caetano P., Ávila A., Sánchez M., Trapero A. & Coelho A. C. 2009. *Phytophthora cinnamomi* Populations on Quercus Forests from Spain and Portugal. In Proceedings of the Fourth Meeting of IUFRO Working Party S07.02.09. 261–269.

Cámara de Comercio de Medellín para Antioquia. 2011. Informes: Estudios económicos: Cadena de Aguacate en Antioquia. 104p.

Cañas G., Galindo L., Arango R. & Saldamando C. 2015. Diversidad genética de cultivares de aguacate (*Persea americana*) en Antioquia. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1): 129–143.

Carranza Y., Morales J., Pedraza M., Chávez A., Morales K. 2015. Aislamiento, identificación y patogenicidad de hongos asociados a la tristeza del aguacatero en Michoacán, México. En actas de Plagas y Enfermedades del VIII Congreso Mundial de la Palta 2015. Recuperado el 12 de Marzo de 2017 de [http://www.avocadosource.com/WAC8/Section\\_03/CarranzaRojasY2015.pdf](http://www.avocadosource.com/WAC8/Section_03/CarranzaRojasY2015.pdf).

Castañeda E. 2009. Búsqueda de portainjertos de aguacate tolerantes-resistentes a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de Doctorado no publicada, Colegio de Postgraduados, Texcoco, México.

Catalogue of life. 2017. *Phytophthora cinnamomi*. Retrieve March 8th, 2017 from: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/8798708/source/tree>.

Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T., Higgins D., Thompson J. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3497-500.

Coffey M. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. In: Plant diseases of international importance. Volume III. Diseases of fruit crops (Ed. by Kumar J., Chaube H., Singh U., Mukhopadhyay A.). Prentice Hall, Englewood Cliffs, USA. 423-444.

Collins S., McComb J., Howard K., Shearer B., Colquhoun I. & Hardy G. 2012. The long-term survival of *Phytophthora cinnamomi* in mature *Banksia grandis* killed by the pathogen. *Forest Pathology*, 42: 28-36.

Cooke D., Duncan J., Williams N., Hagenaar M. & Bonants P. 2000. Identification of *Phytophthora* species on the basis of restriction enzyme fragment analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA. *OEPP/EPPO Bulletin*, 30: 519-523.

del Castillo J., Cárdenas M., Pinzón A., Castañeda A., Bernal A. & Restrepo S. 2013. Developing a taxonomic identification system of *Phytophthora* species based on microsatellites. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(2): 88-95.

Department of Sustainability and Environment. 2008. Victoria's public land *Phytophthora cinnamomi* management strategy. Melbourne, Australia: Department of Sustainability and Environment, 36p.

Dobrowolski, M. 1999. Population and sexual genetics of *Phytophthora cinnamomi* in Australia using microsatellite markers. Thesis for the degree of Doctor unpublished, Murdoch University, Perth, Australia.

Dobrowolski M., Shearer B., Colquhoun I., O'Brien P. & Hardy G. 2008. Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant Pathology*, 57: 928-936.

Douhan G., Fuller E., McKee B. & Pond E. 2011. Análisis genético de la diversidad de portainjertos de raíz de aguacate (*Persea americana* Miller) seleccionados bajo condiciones de invernáculo para la tolerancia a la putrefacción de raíz de *Phytophthora* (PRR) causada por *Phytophthora cinnamomi*. In proceedings VII World Avocado Congress 2011. Recuperado el 13 de Mayo de 2013 de: [http://www.congresomundialdelaguacate2011.com/userfiles/file/Congress%20Proceedings\\_v3.pdf](http://www.congresomundialdelaguacate2011.com/userfiles/file/Congress%20Proceedings_v3.pdf).

Drenth A., Wagels G., Smith B., Sendall B., O'Dwyer C., Irvine G. & Irwin J. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology*, 35: 147-159.

Dudzinski M., Old K. & Gibbs R. 1993. Pathogenic variability in australian isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany*, 41(6): 721-732.

Echemendia Y. 2002. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en fruticultura tropical. Recuperado el 15 de Agosto de 2013 de: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>.

- Eden M., Hill R. & Galpoththage M. 2000. An efficient baiting assay for quantification of *Phytophthora cinnamomi* in soil. *Plant Pathology*, 515-522.
- Eggers J., Balci Y. & MacDonald W. 2012. Variation among *Phytophthora cinnamomi* isolates from oak forest soils in the eastern United States. *Plant Disease*, 96: 1608-1614.
- Erwin C. & Ribeiro K. 1996. *Phytophthora Diseases World-wide*. APS PRESS. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 562p.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2004). Normes OEPP EPPO Standards: *Phytophthora cinnamomi*. *Bulletin OEPP/EPPO*, 34: 201-207.
- Excoffier L., Smouse P. & Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. 2005. Determining the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. FAOSTAT. Retrieve March 13th, 2017 from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>.
- Forero F., García J. & Cárdenas J. 2007. Situación y avances en la poscosecha y procesamiento del aguacate (*Persea americana* Mill.). *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 1(2): 189-200.
- Freeland J. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK.
- Fulgoni V., Dreher M. & Davenport A. 2013. Avocado consumption is associated with better diet quality and nutrient intake, and lower metabolic syndrome risk in US adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2001–2008. *Nutrition Journal*, 12(1).

- Gallo L. & Siverio F. 1995. Influence of soil solarization on *Phytophthora cinnamomi* Rands in avocado (*Persea americana* Mill.). In proceedings of the III World Avocado Congress, 400-403.
- García E., Benezer M., Gutiérrez A., Rangel G., Arreola A. & Castro E. 2010. Regulation of defense responses in avocado roots infected with *Phytophthora cinnamomi* (Rands). *Plant Soil*, 331(1): 45-56.
- García N., Gutiérrez P. & Marín M. 2013. Desarrollo de marcadores microsatélites y mitocondriales para estudios de variación genética de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Bioagro*, 25(2): 91-100.
- Gobierno Australiano (2009). Threat abatement plan for disease in natural ecosystems caused by *Phytophthora cinnamomi*. Recuperado el 13 de Mayo de 2013 de: <http://www.comlaw.gov.au/Details/F2009L02168>.
- Goodwin S. 1997. The Population Genetics of Phytophthora. *Phytopathology*, 87(4): 462-473.
- Greene M., Benson, M. & Ivors, K. 2006. Multilocus sequence analysis of *Phytophthora cinnamomi* from Fraser fir in North Carolina. *Phytopathology*. 96: S42.
- Hardham A. 2005. Pathogen profile: *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular plant pathology*, 6(6): 589-604.
- Hartl D. & Clark A. 1997. Principles of population genetics. Editorial Sinauer Associates Publishers.
- Hedrick P. 2004. Genetics of populations. Jones and Barlett Publishers. Sudbury Massachusetts
- Hüberli D., Tommerup I., Dobrowolski M., Calver M. & Hardy G. 2001. Phenotypic variation in a clonal lineage of two *Phytophthora cinnamomi* populations from Western Australia. *Mycology Research*, 105(9): 1053-1064.
- Huff D., Peakall R. & Smouse P. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt.). *Engelm. Theoretical and Applied Genetics*, 86: 927-934.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

Instituto Colombiano Agropecuario - ICA. 2009. ICA impulsa plan para erradicar 6000 árboles de aguacate en Montes de María. Noticias Área Agrícola. Recuperado el 13 de Mayo de 2013 de: <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2009/ICA-impulsa-plan-para-erradicar-6000-arboles-de-ag.aspx>

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

Kong P., Hong P. & Richardson P. 2003. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes. *Plant pathology*, 52: 681-693.

Kroon L., Brouwer H., Cock A. & Govers F. 2012. The Genus *Phytophthora* Anno 2012. *Phytopathology*, 102: 348-364.

Kumar S., Dudley J., Nei M. & Tamura M. 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*, 9: 299-306.

Lambertini C., Riis T., Olesen B., Clayton J., Sorrell B. and Brix H. 2010. Genetic diversity in three invasive clonal aquatic species in New Zealand. *BMC Genetics*, 11: 2-18.

Lamour K. 2013. *Phytophthora: A Global Perspective*. University of Tennessee, Knoxville, USA. 256p.

Landahl S., Meyer M. & Terry L. 2009. Spatial and Temporal Analysis of Textural and Biochemical Changes of Imported Avocado cv. Hass during Fruit Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*, 57: 7039–7047.

Lara M., Guerrero J., Barriga F., Ávila T. Aguirre S. & Coria V. 2011. Recuperación de árboles de aguacate infectados con *Phytophthora cinnamomi* Rands bajo control biológico y químico. In proceedings VII World Avocado Congress 2011. Recuperado el 13 de Mayo de 2013 de: <http://worldavocadocongress2011.com/userfiles/file/Jesus%20Alejandro%20Guerrero%20Tejeda%201630-1650.pdf>.

- Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T. & Higgins D. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Librado P. & Rozas J. 2009. DnaSP V5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Linde C., Drenth A., Kemp G., Wingfield M. & von Broembsen S. 1997. Population Structure of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa. *Phytopathology*, 87: 822-827.
- Linde C., Drenth A. & Wingfield M. 1999a. Gene and genotypic diversity of *Phytophthora cinnamomi* in South Africa and Australia revealed by DNA polymorphisms. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 667-680.
- Linde C., Drenth A. & Wingfield M. 1999b. Variation in pathogenicity among South African isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 231-239.
- Liu F., Lin Y., Wang S., Gao X., Chen L. & Jia G. 2011. ITS sequence analysis of intraspecific genetic diversity of *Hypoderma rubi*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University*, 1:10.
- Macías O., Delgado Y., Peña E., Betancourt R. & Barreto R. 2006. Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos. Tesis de la Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”. Cuba.
- Marais L. 2004. Avocado diseases of major importance worldwide and their management. Diseases of fruits and vegetables. Ed: Kluwer Academic Publishers. 691p.
- Martin F. & Tooley P. 2004. Identification of *Phytophthora* isolates to species level using Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of a Polymerase Chain Reaction-Amplified Region of Mitochondrial DNA. *Phytopathology*, 94: 983-991.
- Martin F. & Coffey M. 2012. Mitochondrial haplotype analysis for differentiation of isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 102: 229-239.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

- Martínez J. 2002. Respuesta de tres variedades de rosa injertadas en dos patrones, al mildew veloso, *Peronospora sparsa* Berk. Tesis profesional no publicada. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Martínez M., López R., Salgado R., Raya M. & Martínez R. 2011. Folates and *Persea americana* Mill. (Avocado). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 23(3): 204-213.
- Mbaka J., Losenge T., Waiganjo M. & Wamochi L. 2010. Phenotypic variation in three *Phytophthora cinnamomi* populations from macadamia growing areas in Kenya. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 8(1): 900-911.
- McCarren K. 2006. Saprophytic ability and the contribution of chlamydospores and oospores to the survival of *Phytophthora cinnamomi*. Thesis for the degree of Doctor unpublished, Murdoch University, Perth, Western Australia.
- Michalakis Y. & Excoffier L. 1996. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances between Alleles with Special Reference for Microsatellite Loci. *Genetics*. 142: 1061-1064.
- Ministerio de Industria y Comercio. 2016. Aguacate Hass colombiano entra en la recta final para exportar a Estados Unidos. Recuperado el 5 de Marzo de 2017 de: [http://www.mincit.gov.co/publicaciones/37333/aguacate\\_hass\\_colombiano\\_entra\\_en\\_la\\_recta\\_final\\_para\\_exportar\\_a\\_estados\\_unidos](http://www.mincit.gov.co/publicaciones/37333/aguacate_hass_colombiano_entra_en_la_recta_final_para_exportar_a_estados_unidos).
- Mir B., Koul S., Kumar A., Kaul M., Soodan, A. & Raina S. 2010. Intraspecific variation in the internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA in *Withania somnifera* (Linn.) Dunal. *Indian Journal of Biotechnology*, 9: 325-328.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science*, 70: 3321-3323.
- Nei M. 1975. Molecular population genetics and evolution. Editorial North-Holland Press. Amsterdam.
- Nei M. 1979. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949): 283-292

Nei M. & Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press.

Newell G. 1994. The effect of *Phytophthora cinnamomi* on the habitat utilization of *Antechinus stuartii* in a victorian forest. Thesis for the degree of Doctor unpublished, Deakin University, Melbourne, Australia.

O'Brien P. & Hardy G. 2014. *Phytophthora cinnamomi* in Western Australia. *WA science: journal of the Royal Society of Western Australia*, 97: 47-55.

Ochoa Y., Martínez O., Olalde V., Cerna E., Landeros J., Hernández F. & Flores A. 2007. Genetic variability of *Phytophthora cinnamomi* Rands in Michoacán, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(2): 161-166.

Ochoa Y., Cerna E., Landeros J., Vásquez O., Olalde V. & Flores A. 2009. Diversidad genética de *Phytophthora cinnamomi* Rands de aguacate de Michoacán, México, por medio de RAPD. *Revista Phytón*, 78: 25-30.

Old K., Moran G. & Bell J. 1984. Isozyme variability among isolates of *P. cinnamomi* from Australia and Papua New Guinea. *Canadian Journal of Botany*, 62: 2016-2022.

Pagliaccia D., Pond E., McKee B. & Douhan G. 2013. Population genetic structure of *Phytophthora cinnamomi* associated with avocado in California and the discovery of a potentially recent introduction of a new clonal lineage. *Phytopathology*, 103: 91-97.

Pandey A. & Ali M. 2012. Intraspecific variation in *Panax assamicus* Ban. populations based on internal transcribed spacer (ITS) sequences of nrDNA. *Indian Journal of Biotechnology*, 11:30-38.

Pandey S. 2015. Assessing *Phytophthora* Database as a valuable global resources for *Phytophthora* diseases : A review. *International Journal of Scientific Research*, 4(8): 63-64.

Paquin B., Laforest M., Forget L., Roewer I., Wang Z., Longcore J. & Franz B. 1997. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. *Current Genetic*, 31: 380-395.

Peakall R. & Smouse P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

- Pinto J. Donnely M., Souza C., Gil V., Ferreira C., Elissa, N., do Rosário V. & Charlwood J. 2002. Genetic structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in São Tomé and Príncipe (West Africa): implications for malaria control. *Molecular ecology*, 11: 2183-2187.
- Pritchard J., Stephens M. & Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Ramírez J., Castañeda D. & Morales J. 2014. Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres*, 61(1): 50-61.
- Ramírez J., Castañeda D. & Morales J. 2016. Production of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi* Rands under different management regimes. *Plant Pathology*, 66(4), 623-632.
- Raven P., Evert R. & Eichhorn S. 1999. Biology of plants. Six<sup>th</sup> edition. New York. WH Freeman and Company. 944 p.
- Reader U. & Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.
- Red de Información y Comunicación Estratégica del Sector Agropecuario – AGRONET. Sistema de estadísticas agropecuarias - SEA. Recuperado el 12 de marzo de 2017 de: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>.
- Risnoyatningsih S. 2010. Biodiesel from avocado seeds by transesterification process. *Jurnal Teknik Kimia*, 5(1): 345-351.
- Ristaino J., Madritch M., Trout C. & Parra G. 1998. PCR Amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and environmental microbiology*, 64(3): 948-954.
- Robin C. & Desprez M. 1998. Testing variability in pathogenicity of *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 465-475.

Rodríguez M., Jaramillo J. & Orozco J. 2009. Colecta de aguacates criollos colombianos como base para iniciar programas de fitomejoramiento que contribuyan a su competitividad. En actas del III Congreso Latinoamericano de Aguacate. Medellín, Colombia. 14-27. Recuperado el 13 de Mayo de 2013 de: <http://corpoaguacate.com/pdf/conferencias/pdf/Colecta%20de%20aguacates%20criollos%20colombianos.pdf>.

Ruiz G. 1912. Boletín No. 71. Estación Agrícola Central Cultivo y explotación del Aguacate.

Saitou N. & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution journal*, 4(4): 406-25.

Salto M. 2006. Estandarización de la técnica de PCR en Tiempo Real para la detección cuantitativa de *Babesia bigemina* en muestras sanguíneas. Tesis Profesional no publicada, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.

Sánchez J. 2007. Identificación de marcadores asociados a la resistencia del aguacate raza mexicana (*Persea americana* Mill. var. *Drymifolia*) al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y el Centro Multidisciplinario de estudios en Biotecnología de la UMSNH.

Scanu B., Hunter G., Linaldeddu B., Franceschini A., Maddau L., Jung T. & Denman S. 2014. A taxonomic re-evaluation reveals that *Phytophthora cinnamomi* and *P. cinnamomi* var. *parvispora* are separate species. *Forest Pathology*, 44: 1-20.

Schaffer B., Wolstenholme B. & Whiley A. 2013. The Avocado Botany, production and uses. CABI Publishing. 416p.

Schreier S. 2013. Diversity among isolates of *Phytophthora cinnamomi* from ornamental plants in South Carolina. Thesis for the degree of Master of Science unpublished. Clemson University.

Shepherd C., Pratt B. & Taylor P. 1974. Comparative Morphology and Behaviour of A1 and A2 Isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Australian Journal of Botany*, 22(3): 461-470.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIEN-  
TOS DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

---

- Silva M. 2011. Variabilidad patogénica, diversidad genética y estructura poblacional de *Cochliobolus sativus*, agente causal de la mancha borrosa de la cebada. Tesis Profesional no publicada, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo, Uruguay.
- Sokal R. & Rohlf F. 1995. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman, New York.
- Stoddard J. & Taylor J. 1988. Genotypic diversity: Estimation and prediction in samples. *Genetics* 118: 705-711
- Tajima F. & Nei M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1: 269-285.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tajima F. 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*. 143: 1457-1465.
- Tamayo P. 2007. Enfermedades del aguacate. *Politécnica*, 4: 51-70.
- Tofiño A., Cabal D. & Gil L. 2012. Análisis de componentes del sistema productivo de aguacate, con incidencia probable de *Phytophthora* en Cesar, Colombia. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 16(2): 63-90.
- Tommerup I., Dobrowolski, M. & Shearer B. 1999. Risks and threats due to genetic variation in *Phytophthora cinnamomi*. In: *Phytophthora Diseases of Forest Trees*. First International Meeting on Phytophthoras in Forest and Wildland Ecosystems. Forest Research Laboratory, Oregon State University. 55-63.
- Torres V. 2009. La competitividad del aguacate mexicano en el mercado estadounidense. *Revista de Geografía Agrícola*, 43.

Vilgalys lab. 2016. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. Retrieve November 18th, 2016 from: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>.

Villalobos G., Orozco G., Lopez M., Lopez E., Córdoba A., Rangel L., Olivo A.,... Martínez F. 2014. Suitability of internal transcribed spacers (ITS) as markers for the population genetic structure of *Blastocystis* spp. *Parasites & Vectors*, 7: 461.

Violi H., Brown J., Tondo C., Borrone J., Ploetz R. & Schnell R. 2009. Microsatellite markers reveal low breeding system efficacy and pollen contamination can limit production of full-sib avocado progeny. *Scientia Horticultureae*, 120(3): 360-366.

Wilkinson C., Shearer B., Jackson T. & Hardy, G. 2001. Variation in sensitivity of Western Australian isolates of *Phytophthora cinnamomi* to phosphite *in vitro*. *Plant Pathology*, 50: 83-89.

World Phytophthora Collection (WPC). Retrieve November 18th, 2016 from: <http://phytophthora.ucr.edu/database.html>

Zentmyer G. 1957. The search for resistant rootstocks in Latin America. California Avocado Society. *Yearbook*, 41: 101-106.

Zentmyer G., Thorn W. & Burns R. 1963. The Duke avocado. California Avocado Society. *Yearbook*, 47: 28-36

Zentmyer G., Leary J., Klure L. & Grantham G. 1976. Variability in growth of *Phytophthora cinnamomi* in relation to temperature. *Phytopathology*, 66: 982-986.

Zentmyer G. 1977. Origin of *Phytophthora cinnamomi*: Evidence that it is not an indigenous fungus in the Americas. *Phytopathology*, 67: 1373-1377.

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1

	AISLAMIE NTO	CÓD IGO	SUBR EGIÓ N	CULTIVA R	MUNI CIPIO	ESTADO DEL ÁRBOL	MORFOL OGIA	TAMAÑ O DE COLON IA (cm)	CRECIMIE NTO PROMEDIO DE COLONIA (cm/d)	HAPLOTI PO ANTIOQU IA	HAPLO TIPO MUNDO	GENOTIPO
1	ANABCI - FE3E - PC	COE NOR 004	Orient e	Comercial	Abejorr al	Sintomátic o	Roseta	5,26	0,668	1	1	001
2	ANABTE - FE1E - PC	COE NOR 018	Orient e	Comercial	Abejorr al	Sintomátic o	Roseta	5,74	0,664	1	1	110
3	ANABTE - FE2E - PC	COE NOR 019	Orient e	Comercial	Abejorr al	Sintomátic o	Roseta	4,65	0,539	1	1	011
4	ANAMIM - FE1E - PC	COE NSU 007	Suroes te	Comercial	Amagá	Sintomátic o	Estrella	3,94	0,418	2	9	010
5	ANAMIM - FE2E - PC	COE NSU 008	Suroes te	Comercial	Amagá	Sintomátic o	Roseta	6,13	0,722	1	1	001
6	ANAMIM - FE3E - PC	COE NSU 009	Suroes te	Comercial	Amagá	Sintomátic o	Roseta	5,51	0,637	2	9	001
7	ANAMIMB 1A7	COS ASU 001	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,82	0,874	2	9	111
8	ANAMIMB 2A4	COS ASU 002	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	7,16	0,917	2	9	001
9	ANAMIMB 2A7	COS ASU 003	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,24	0,778	2	9	100
10	ANAMIMB 3A1	COS ASU 004	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Estrella	3,71	0,373	1	1	111

11	ANAMIMB 3A2	COS ASU 005	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Estrella	4,39	0,442	1	1	000
12	ANAMIMB 3A7	COS ASU 006	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Estrella	3,93	0,417	1	1	000
13	ANAMIMB 4A1	COS ASU 007	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	7	0,839	1	1	001
14	ANAMIMB 4A10	COS ASU 008	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	5,7	0,658	2	9	110
15	ANAMIMB 4A2	COS ASU 009	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,45	0,754	1	1	011
16	ANAMIMB 4A5	COS ASU 010	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,8	0,907	1	1	001
17	ANAMIMB 4A6	COS ASU 011	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	4,75	0,557	2	9	111
18	ANAMIMB 4A7	COS ASU 012	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	5,37	0,63	2	9	111
19	ANAMIMB 5A2	COS ASU 013	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,28	0,739	2	9	000
20	ANAMIMB 5A3	COS ASU 014	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	7,76	0,994	1	1	111
21	ANAMIMB 5A7	COS ASU 015	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Estrella	3,67	0,364	2	9	000
22	ANAMIMB 6A1	COS ASU 016	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,81	0,865	1	1	001

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

23	ANAMIMB 6A2	COS ASU 017	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,32	0,781	2	9	011
24	ANAMIMB 6A3	COS ASU 018	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,49	0,802	2	9	011
25	ANAMIMB 6A5	COS ASU 019	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	6,57	0,802	2	9	011
26	ANAMIMB 6A6	COS ASU 020	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Sin Patrón	6,63	0,958	2	9	011
27	ANAMIMB 6A7	COS ASU 021	Suroes te	Comercial	Amagá	Asintomáti co	Roseta	5,98	0,702	2	9	010
28	ANAMSJ - FE1E - PC	COE NSU 011	Suroes te	Comercial	Amagá	Sintomáti co	Roseta	5,6	0,628	2	9	110
29	ANAMSJ - FE2E - PC	COE NSU 010	Suroes te	Comercial	Amagá	Sintomáti co	Roseta	4,21	0,419	1	1	111
30	ANAMSJ - FE3E - PC	COE NSU 012	Suroes te	Comercial	Amagá	Sintomáti co	Estrella	4,47	0,524	1	1	001
31	ANAMSJ - FS2E - PC	COS ASU 026	Suroes te	Comercial	Amagá	Sintomáti co	Roseta	5,81	0,678	1	1	111
32	ANEPLA - FE1E - PC	COE NOR 009	Orient e	Comercial	El Peñol	Sintomáti co	Roseta	6,03	0,68	2	9	001
33	ANEPLA - FE2E - PC	COE NOR 023	Orient e	Comercial	El Peñol	Sintomáti co	Roseta	5,24	0,592	1	1	110
34	ANEPLA - FE3E - PC	COE NOR 010	Orient e	Comercial	El Peñol	Sintomáti co	Sin Patrón	5,62	0,733	2	9	001

35	ANEPLAB1 A3	COS AOR 001	Orient e	Comercial	El Peñol	Asintomáti co	Sin Patrón	5,44	0,67	2	9	001
36	ANEPLAB3 A1	COS AOR 003	Orient e	Comercial	El Peñol	Asintomáti co	Roseta	4,46	0,565	2	9	111
37	ANEPLAB4 A4	COS AOR 005	Orient e	Comercial	El Peñol	Asintomáti co	Roseta	5,36	0,679	1	1	111
38	ANEPLAB4 A7	COS AOR 007	Orient e	Comercial	El Peñol	Asintomáti co	Roseta	5,5	0,614	1	1	111
39	ANEPLAB6 A1	COS AOR 008	Orient e	Comercial	El Peñol	Asintomáti co	Estrella	3,76	0,392	2	9	111
40	ANEPLAB6 A7	COS AOR 009	Orient e	Comercial	El Peñol	Asintomáti co	Roseta	7,56	1,023	2	9	111
41	ANEPLAB6 A9	COS AOR 010	Orient e	Comercial	El Peñol	Asintomáti co	Sin Patrón	4,04	0,563	1	1	111
42	ANER102	CRS AOR 004	Orient e	Criollo	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	6,09	0,69	2	9	111
43	ANEREC - FE2E - PC	COE NOR 005	Orient e	Comercial	El Retiro	Sintomáti co	Roseta	4,91	0,59	2	9	110
44	ANEREC - FE3E - PC	COE NOR 006	Orient e	Comercial	El Retiro	Sintomáti co	Estrella	3,82	0,411	2	9	001
45	ANERECB 2A9	COS AOR 011	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	5,67	0,661	2	9	000
46	ANERECB 3A9	COS AOR 012	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	5,21	0,63	2	9	000

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

47	ANERECB 4A5	COS AOR 013	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	5,97	0,81	2	9	000
48	ANEREG - FE1E - PC	COE NOR 007	Orient e	Comercial	El Retiro	Sintomáti co	Sin Patrón	6,68	0,903	2	9	000
49	ANEREG - FE2E - PC	COE NOR 021	Orient e	Comercial	El Retiro	Sintomáti co	Roseta	5,68	0,709	1	1	000
50	ANEREG - FE3E - PC	COE NOR 008	Orient e	Comercial	El Retiro	Sintomáti co	Estrella	3,81	0,396	1	1	001
51	ANEREGB 1A1	COS AOR 014	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	6,81	0,933	1	1	110
52	ANEREGB 2A4	COS AOR 016	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Estrella	4,52	0,506	2	9	001
53	ANEREGB 2A6	COS AOR 017	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	3,77	0,392	2	9	001
54	ANEREGB 3A2	COS AOR 018	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	6,65	0,829	2	9	111
55	ANEREGB 4A3	COS AOR 019	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Estrella	3,66	0,385	2	9	111
56	ANEREGB 5A1	COS AOR 020	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	5,32	0,631	2	9	111
57	ANEREGB 6A5	COS AOR 021	Orient e	Comercial	El Retiro	Asintomáti co	Roseta	5,94	0,804	2	9	110
58	ANJABV - FE1E - PC	COE NSU 003	Suroes te	Comercial	Jardín	Sintomáti co	Roseta	3,31	0,302	4	3	111

59	ANJABV - FE2E - PC	COE NSU 004	Suroeste	Comercial	Jardín	Sintomático	Roseta	3,36	0,293	5	11	111
60	ANJABV - FE3E - PC	COE NSU 005	Suroeste	Comercial	Jardín	Sintomático	Roseta	5,96	0,714	2	9	111
61	ANJABVB2 A2	COS ASU 027	Suroeste	Comercial	Jardín	Asintomático	Roseta	6,2	0,731	1	1	111
62	ANJABVB2 A6	COS ASU 022	Suroeste	Comercial	Jardín	Asintomático	Roseta	6,52	0,85	1	1	010
63	ANJABVB2 A8	COS ASU 023	Suroeste	Comercial	Jardín	Asintomático	Roseta	5,89	0,64	-	-	000
64	ANJABVB3 A10	COS ASU 024	Suroeste	Comercial	Jardín	Asintomático	Roseta	5,27	0,633	5	11	001
65	ANJABVB6 A1	COS ASU 025	Suroeste	Comercial	Jardín	Asintomático	Roseta	5,57	0,65	2	9	111
66	ANJAEP - FE1E - PC	COE NSU 006	Suroeste	Comercial	Jardín	Sintomático	Roseta	3,89	0,399	1	1	111
67	ANJAEP - FE3E - PC	COE NSU 013	Suroeste	Comercial	Jardín	Sintomático	Estrella	3,84	0,398	2	9	001
68	ANMA104	CRS AOR 001	Oriente	Criollo	Marinilla	Asintomático	Estrella	5,88	0,658	2	9	111
69	ANMAAB - FE1E - PC	COE NOR 001	Oriente	Comercial	Marinilla	Sintomático	Estrella	4,66	0,551	3	10	111
70	ANMAAB - FE2E - PC	COE NOR 002	Oriente	Comercial	Marinilla	Sintomático	Roseta	4,95	0,541	2	9	101

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

71	ANMAAB- FE3E-PC	COE NOR 003	Orient e	Comercial	Marinil la	Sintomátic o	Estrella	4,92	0,596	2	9	111
72	ANMALC - FE1E - PC	COE NOR 013	Orient e	Comercial	Marinil la	Sintomátic o	Roseta	5,2	0,578	1	1	001
73	ANMALC - FE2E - PC	COE NOR 014	Orient e	Comercial	Marinil la	Sintomátic o	Roseta	6,18	0,776	2	9	011
74	ANMALC - FE3E - PC	COE NOR 015	Orient e	Comercial	Marinil la	Sintomátic o	Roseta	6,35	0,814	1	1	001
75	ANMALN - FE1E - PC	COE NOR 026	Orient e	Comercial	Marinil la	Sintomátic o	Roseta	6,92	0,882	1	1	111
76	ANMALN - FE2E - PC	COE NOR 027	Orient e	Comercial	Marinil la	Sintomátic o	Roseta	5,79	0,685	1	1	011
77	ANMALN - FE3E - PC	COE NOR 028	Orient e	Comercial	Marinil la	Sintomátic o	Roseta	5,77	0,734	2	9	101
78	ANMALN - FS3E - PC	COS AOR 033	Orient e	Comercial	Marinil la	Asintomáti co	Roseta	5,32	0,644	2	9	001
79	ANRILE - FE2E - PC	COE NOR 011	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Sintomátic o	Roseta	7,14	0,872	1	1	111
80	ANRILE - FE3E - PC	COE NOR 012	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Sintomátic o	Roseta	6	0,741	2	9	111
81	ANRILEB1 A2	COS AOR 035	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	7,38	0,968	2	9	111
82	ANRILEB2 A5	COS AOR 023	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	5,98	0,702	1	1	011

83	ANRILEB3 A1	COS AOR 024	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	6,37	0,777	2	9	011
84	ANRILEB3 A10	COS AOR 025	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	6,89	0,898	2	9	001
85	ANRILEB3 A9	COS AOR 026	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	7,97	1,126	1	1	001
86	ANRILEB4 A2	COS AOR 027	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	6,59	0,814	2	9	011
87	ANRILEB4 A5	COS AOR 028	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	6,55	0,843	2	9	101
88	ANRILEB4 A7	COS AOR 029	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	7,01	0,907	2	9	111
89	ANRILEB5 A1	COS AOR 030	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	7,17	0,957	1	1	101
90	ANRILEB6 A2	COS AOR 031	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	6,8	0,842	1	1	111
91	ANRILEB6 A9	COS AOR 032	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	6,57	0,895	2	9	001
92	ANRILG - FE2E - PC	COE NOR 024	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Sintomáti co	Roseta	5,74	0,702	1	1	011
93	ANRILG - FE3E - PC	COE NOR 025	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Sintomáti co	Roseta	6,09	0,738	2	9	111
94	ANRILG - FS2E - PC	COS AOR 034	Orient e	Comercial	Rioneg ro	Asintomáti co	Roseta	5,45	0,668	2	9	000

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS  
DE *Phytophthora cinnamomi* OBTENIDOS DE HUERTOS DE AGUACATE  
DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA, COLOMBIA

95	ANRN92	CRS AOR 002	Oriente	Criollo	Rionegro	Asintomático	Roseta	6,3	0,802	1	1	011
96	ANRR84	CRS ASU 001	Suroeste	Criollo	Urroa	Asintomático	Roseta	6	0,713	2	9	000
97	ANRR85	CRS ASU 002	Suroeste	Criollo	Urroa	Asintomático	Roseta	6,16	0,75	2	9	000
98	ANRR86	CRS ASU 003	Suroeste	Criollo	Urroa	Asintomático	Roseta	5,2	0,681	1	1	111
99	ANRR89	CRS ASU 004	Suroeste	Criollo	Urroa	Asintomático	Estrella	5,07	0,654	2	9	001
100	ANRRLN - FE1E - PC	COE NSU 001	Suroeste	Comercial	Urroa	Sintomático	Roseta	5,65	0,749	2	9	000
101	ANRRLN - FE2E - PC	COE NSU 002	Suroeste	Comercial	Urroa	Sintomático	Roseta	5,31	0,6	2	9	111
102	ANSPCS - FE1E - PC	COE NNO 001	Norte	Comercial	San Pedro de los Milagros	Sintomático	Roseta	6,21	0,801	1	1	110
103	ANSPCS - FE2E - PC	COE NNO 004	Norte	Comercial	San Pedro de los Milagros	Sintomático	Roseta	6,68	0,794	2	9	101
104	ANSPCS - FE3E - PC	COE NNO 002	Norte	Comercial	San Pedro de los Milagros	Sintomático	Roseta	4,34	0,447	2	9	000

105	ANSPEB - FE2E - PC	COE NNO 003	Norte	Comercial	San Pedro de los Milagros	Sintomático	Roseta	5,57	0,683	1	1	011
106	ANSPEBB5 A2	COS ANO 001	Norte	Comercial	San Pedro de los Milagros	Asintomático	Roseta	5,21	0,653	2	9	001
107	ANSPEBB5 A3	COS ANO 002	Norte	Comercial	San Pedro de los Milagros	Asintomático	Roseta	5,93	0,756	1	1	100
108	ANSS07	CRS AOR 003	Oriente	Criollo	Sonsón	Asintomático	Roseta	4,37	0,445	2	9	010
109	ANSS45EN F	CRE NOR 001	Oriente	Criollo	Sonsón	Sintomático	Roseta	6,46	0,802	1	1	111
110	ANSVLM - FE1E - PC	COE NOR 029	Oriente	Comercial	San Vicente Ferrer	Sintomático	Roseta	7,36	0,938	-	-	001
111	ANSVLM - FE2E - PC	COE NOR 016	Oriente	Comercial	San Vicente Ferrer	Sintomático	Roseta	6,16	0,723	1	1	110
112	ANSVLM - FE3E - PC	COE NOR 017	Oriente	Comercial	San Vicente Ferrer	Sintomático	Roseta	5,55	0,656	1	1	111