

## DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLAMIENTOS DE *Phytophthora infestans* EN PLANTACIONES DE PAPA EN COSTA RICA CON EL USO DE RAPDS<sup>1</sup>

Oswaldo Páez<sup>2</sup>, Roberto Valverde\*, Luis Gómez\*, Arturo Brenes\*

**Palabras clave:** *Phytophthora infestans*, tizón tardío, papa, RAPD, diversidad genética,  $G_{st}$ , Costa Rica.  
**Key words:** *Phytophthora infestans*, late blight, potato, RAPD, genetic diversity,  $G_{st}$ , Costa Rica.

Recibido: 06/12/04

Aceptado: 23/02/05

### RESUMEN

Para determinar la diversidad genética de *Phytophthora infestans* en Costa Rica, 62 aislamientos de este patógeno fueron recolectados en plantaciones de papa en las zonas de Cartago, Zarcero, Fraijanes y Heredia durante 1999-2001 y analizados con el uso de RAPDs. Todos los aislamientos fueron previamente evaluados para el tipo de apareamiento y la resistencia al metalaxyl. Se seleccionó 11 imprimadores con los cuales fue posible formar 17 grupos RAPD cuyas frecuencias variaron de 0,55 a 0,02. En el grupo más frecuente se encontró aislamientos resistentes y sensibles provenientes de todas las zonas muestreadas. Todos los aislamientos en los 17 grupos mostraron una alta relación genética. La mayor diversidad genética se encontró entre aislamientos y no se observó ninguna sub-estructuración poblacional de acuerdo a las zonas o sensibilidad al metalaxyl. Al comparar los aislamientos costarricenses con los aislamientos foráneos US-1, US-18 y EC-1, no se observó ninguna relación genética entre ambas poblaciones; de hecho, el coeficiente de diferenciación genética  $G_{st}$  mostró que la población local es diferente a la de los aislamientos foráneos. El análisis con los RAPDs reveló que la población de *P. infestans*, en las plantaciones de papa en Costa Rica, es diversa aunque probablemente los aislamientos comparten un ancestro en común.

### ABSTRACT

**Genetic diversity of *Phytophthora infestans* isolates collected in potato fields of Costa Rica using RAPDs.** In order to determine the genetic diversity of *Phytophthora infestans* in Costa Rica, a total of 62 isolates were collected in potato-growing regions of Cartago, Zarcero, Heredia and Fraijanes during 1999-2001 and subjected to a RAPD analysis. All isolates were previously assayed for mating type and metalaxyl resistance. By using 11 primers, it was possible to generate 17 RAPD genotypes, with frequencies ranging from 0.55 to 0.02. Resistant and susceptible isolates coming from all sampled zones were found in the most frequent group. All isolates from the 17 groups showed a genetic relationship. The highest genetic variation was found among isolates; therefore, the population structure was not fractioned as a result of the production zone or the sensitivity to metalaxyl. Analyses with the  $G_{st}$  coefficient showed no genetic similarities between Costa Rican and the foreign (US-1, US-18, and EC-1) isolates. In conclusion, RAPD analysis revealed the genetic diversity of the *P. infestans* population in Costa Rican potato fields, although there is a possibility that all isolates are sharing a common ancestor.

1/ Este trabajo es parte de la tesis M.Sc. del primer autor. Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica.

2/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

## INTRODUCCIÓN

El tizón tardío de la papa, causado por el patógeno Chromista-Oomicete *Phytophthora infestans*, es una enfermedad que representa un obstáculo importante para la producción de este cultivo en Costa Rica. La producción de papa en el país se lleva a cabo durante todo el año y en áreas que poseen condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad, lo cual permite al patógeno mantener una alta cantidad de inóculo en el campo. Esta situación es contraria a la producción de papa que se realiza de forma estacional en Europa y Norteamérica donde el tizón tardío debe reiniciar su ciclo nuevamente en cada estación de cultivo.

En las últimas 2 décadas, los cambios genéticos en las poblaciones de este patógeno alrededor del mundo han ocurrido de forma acelerada, debido principalmente a 2 fenómenos: la aparición de cepas resistentes al metalaxyl; y la aparición del tipo de apareamiento A2 donde antes no existía. Ambos fenómenos ocurrieron desde inicios de la década de los 80s en Europa (Hohl e Iselin 1984, Gisi y Cohen 1996). En un primer momento, dichos fenómenos parecieron estar relacionados; sin embargo, estos ocurrieron de forma independiente. En el primer caso, la resistencia al metalaxyl se originó por la selección de cepas resistentes (Gisi y Cohen 1996), mientras que el segundo, ocurrió a partir de la migración de cepas A2 desde México, potencial centro de diversidad de *P. infestans* (Goodwin y Drenth 1997).

Posterior a estos 2 fenómenos, otras migraciones alrededor del mundo han contribuido a los cambios poblacionales de *P. infestans*, dando como resultado un incremento en la diversidad del patógeno y un aumento en la severidad de la enfermedad. Estos cambios poblacionales han sido estimados por la presencia y frecuencia de los genotipos viejos y nuevos, caracterizados según las razas fisiológicas, el tipo de apareamiento, las aloenzimas Glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*) y Peptidasa (*Pep*), los haplotipos de ADN mitocondrial (mtADN) y los patrones RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, por su siglas en inglés) con la sonda RG57. Las poblaciones viejas

están formadas por genotipos que son sensibles al fungicida metalaxyl, tipo de apareamiento A1, aloenzima *Gpi* 86/100 ó 100/100, aloenzima *Pep* 92/92, 92/100 ó 100/100, haplotipo mtADN Ib, un patrón específico RFLP-RG57 y pocos genes de virulencia. El genotipo que mejor representa a las poblaciones viejas es el US-1 y sus variantes, los cuales difieren del primero en 1 ó 2 bandas del patrón RFLP-RG57. Por otro lado, las poblaciones nuevas están formadas por genotipos que son sensibles o resistentes al fungicida metalaxyl, tipo de apareamiento A1 o A2, aloenzima *Gpi* y *Pep* diferentes a las poblaciones viejas, haplotipo mtADN Ia, IIa o IIb, patrón RFLP-RG57 diferente al US-1 y una mayor cantidad de genes de virulencia.

En Norteamérica, por ejemplo, la aparición de cepas resistentes al metalaxyl y de aislamientos con tipo de apareamiento A2 a inicios de los 90s, ocurrió por la migración de cepas desde el norte de México. Estas cepas se distribuyeron a través de los EE.UU. hasta llegar a Canadá (Goodwin *et al.* 1996). Los cambios en estas poblaciones norteamericanas siguen siendo activos, producto de nuevas migraciones y recombinaciones de los genotipos inmigrantes con los genotipos preexistentes (Goodwin *et al.* 1998, Gavino *et al.* 2000, Wangsomboondee *et al.* 2002). En los países del Este Asiático, las poblaciones viejas de *P. infestans* formadas por el genotipo US-1, han sido desplazadas por nuevos genotipos inmigrantes resistentes al fungicida metalaxyl y del tipo de apareamiento A2 (Koh *et al.* 1994, Ghimire *et al.* 2003). En el Norte de África, los cambios observados en aislamientos de *P. infestans* recolectados entre 1996 y 1998, han sido causados por migraciones de nuevos genotipos provenientes de Europa (Sedegui *et al.* 2000). En Sudamérica, específicamente en Ecuador, nuevos genotipos como el EC-1 han sido introducidos desplazando a las poblaciones viejas formadas por el genotipo US-1 (Forbes *et al.* 1997). En Perú, las poblaciones de *P. infestans* han cambiado dramáticamente desde mediados de 1980, con migraciones de cepas provenientes de Ecuador, las cuales también han sido encontradas en Colombia y Venezuela (Pérez *et al.* 2001). En Perú también se ha encontrado nuevos genotipos,

como el PE-3, producto de mutaciones o recombinaciones asexuales de los genotipos existentes (Pérez *et al.* 2001). En Europa, a partir de los 80s, los cambios poblacionales de *P. infestans* se han mantenido muy activos a causa de las migraciones entre países y recombinaciones de las cepas inmigrantes con las preexistentes (Gisi y Cohen 1996, Dowley *et al.* 2000, Knapova y Gisi 2002). En Israel, las poblaciones de *P. infestans* han sufrido 3 grandes cambios en las últimas 2 décadas, producto de nuevos genotipos provenientes de Europa, a través de la importación de semilla de papa, y subsecuente recombinación de los genotipos inmigrantes con los genotipos locales (Cohen 2002).

De esta manera, las migraciones de *P. infestans* han sido una vía importante en los cambios actuales de las poblaciones de este patógeno alrededor del mundo. Así, la coexistencia de los genotipos nuevos con los genotipos locales, sumado a los cambios en la frecuencia de linajes clonales y posibles recombinaciones, son vías adicionales que contribuyen a los cambios genéticos. Ejemplos de esto, son la aparición en EE.UU. de genotipos más agresivos, resultado de la recombinación de los genotipos locales con los genotipos inmigrantes desde México (Gavino *et al.* 2000), o el aumento en la diversidad fenotípica en las poblaciones europeas de *P. infestans* producto de procesos locales, que incluyen la recombinación sexual y especificidad del hospedero, posterior a las migraciones (Knapova y Gisi 2002).

No siempre el incremento en la agresividad de las poblaciones de *P. infestans* es atribuible a la migración de nuevos genotipos, ni a la recombinación de los genotipos inmigrantes con los genotipos locales. Tal es el caso de Sudáfrica, donde la severidad de las epidemias de tizón tardío en plantaciones de papa, son atribuidas a las condiciones favorables del ambiente para el desarrollo de la enfermedad, a la resistencia del patógeno a fungicidas fenilamidas como el metaxyl, y muy probablemente a la implementación incorrecta de programas de aplicación de fungicidas; pero no a la inmigración de nuevos genotipos (McLeod *et al.* 2001). Este hecho muestra como

los cambios genéticos en las poblaciones de *P. infestans*, ocurridos a partir de la década de los 80s, también son afectados por factores ambientales locales y las prácticas de cultivo.

En Costa Rica, la evaluación de aislamientos de *P. infestans*, parece indicar que las poblaciones actuales no han sufrido cambios recientes atribuibles al flujo de genes. Goodwin *et al.* (1994), evaluaron 8 aislamientos costarricenses de *P. infestans* recolectados entre 1982 y 1993, los cuales resultaron con el tipo de apareamiento A1, pero no pudieron ser clasificados dentro de los parámetros estándar para *P. infestans* como poblaciones viejas o nuevas. Sánchez *et al.* (2000), también evaluaron el tipo de apareamiento en 18 aislamientos costarricenses y caracterizaron 7 con RFLP-RG57, la totalidad de los aislamientos de su estudio resultó ser del tipo de apareamiento A1 y con un patrón de RFLP-RG57 parecido a un aislamiento de Canadá (BC-1). Al igual que en el estudio de Goodwin *et al.* (1994), estos aislamientos no pudieron ser relacionados con los de otros países, para identificarlos como aislamientos pertenecientes a las poblaciones viejas o nuevas.

Hoy día existe una gran cantidad de técnicas moleculares para el estudio de la estructura genética de poblaciones de patógenos. El análisis con RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, por sus siglas en inglés), es una técnica basada en PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés), herramienta muy útil para la detección de variación tanto en regiones codificantes como no codificantes de los genomas. El análisis con RAPDs usa imprimadores cortos que son seleccionados de forma arbitraria y que amplifican fragmentos de ADN genómico al azar (Williams *et al.* 1990). Los patrones obtenidos pueden ser utilizados para determinar tanto la variación genética entre grupos como entre individuos de un mismo grupo. Algunos ejemplos del uso de los RAPDs en la determinación de la variabilidad genética se encuentran en los trabajos de Mahuku *et al.* (1997), quienes lograron caracterizar *Leptosphaeria maculans*, además, mencionan otros trabajos en los que ha

sido posible caracterizar la variabilidad genética en *Fusarium oxysporum*, *Pyrenophora teres*, *Collectotrichum gloeosporioides* y *Didymella bryoniae*. En *P. infestans*, el análisis de la variación genética con RAPDs y AFLPs es cada día más utilizado (Punja *et al.* 1998, Testa y Cristinzio 1999, Dowley *et al.* 2000, Pérez *et al.* 2001, Zhu y Wu 2001, Daayf *et al.* 2001, Ochowo *et al.* 2002, Abu-El Samen *et al.* 2003a).

Para establecer estrategias de control más efectivas contra el tizón tardío es necesario conocer más acerca de la variación genética de las poblaciones locales de *P. infestans*, así como de los factores que inducen esta variación (Fry *et al.* 1993). Páez *et al.* (2001) encontraron un alto nivel de resistencia al metalaxyl en aislamientos costarricenses recolectados en plantaciones de papa. Se encontró una sub-población resistente y otra sensible al fungicida metalaxyl. Posteriormente, Páez *et al.* (2004) realizaron un análisis molecular del tipo de apareamiento, utilizando los mismos aislamientos del trabajo publicado en el 2001. Sólo se encontró el tipo de apareamiento A1, lo cual parece indicar que las poblaciones en estudio están formadas por linajes clonales. Sin embargo, no se conoce mucho acerca de la variación genética en estas poblaciones. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar, con el uso de RAPDs, la diversidad genética de aislamientos costarricenses de *P. infestans* provenientes de plantaciones de papa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos evaluados

Se evaluó 62 aislamientos recolectados en las diferentes zonas productoras de papa en Costa Rica. Treinta y nueve aislamientos procedieron de Cartago, 16 de Zarcero, 4 de San Joaquín de Flores (Heredia) y 3 de la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica (Frajanes, Alajuela). La recolección de los aislamientos se llevó a cabo de marzo de 1999 a febrero de 2001. Todos los aislamientos usados

en este estudio fueron previamente evaluados para determinar tanto su resistencia al metalaxyl (Páez *et al.* 2001) como su tipo de apareamiento (Páez *et al.* 2004). Por lo tanto, en el estudio se incluyeron tanto aislamientos resistentes como sensibles.

### Cultivo de *P. infestans*

Cada aislamiento de *P. infestans* se cultivó en un medio líquido de arveja. Para la preparación de este medio se tomó 200 g de arvejas frescas y se licuaron con 500 ml de agua destilada. La mezcla se filtró usando un "colador de cocina". Al filtrado se le agregó 20 g de sacarosa y se llevó a un volumen final de 1 litro. El medio fue dispensado en frascos de vidrio tipo "Gerber" (7x5,5 cm) donde se colocó un volumen de 20 ml. Posteriormente, el medio fue esterilizado en una autoclave. En una cámara de transferencia, se procedió a inocular cada frasco con un disco de 8-10 mm de diámetro, tomado de la zona de crecimiento activo de los aislamientos crecidos en medio sólido de Centeno B-Agar (Caten y Jinks 1968). Todos los frascos se incubaron a 18°C y en oscuridad.

Después de 2 semanas de crecimiento, se cosechó el micelio fresco, se lavó con agua destilada y fue almacenado a -4°C hasta realizar las extracciones de ADN. Cuando el micelio cosechado no se usó inmediatamente, fue liofilizado y almacenado a -20°C.

### Extracción de ADN

Se extrajo ADN de micelio fresco y liofilizado de aislamientos locales y de micelio liofilizado de aislamientos control con tipo de apareamiento conocido. El micelio liofilizado de aislamientos control US-1 y EC-1, con tipo de apareamiento A1, fue suministrado por el Centro Internacional de la Papa (CIP), Perú. El micelio liofilizado del aislamiento control US-18, con tipo de apareamiento A2, fue suministrado por la Universidad Estatal de Carolina del Norte, EE.UU.

El ADN de *P. infestans* fue extraído de acuerdo a Lee y Taylor (1990). Entre 40-80 mg de micelio fresco secado por filtración al vacío,

fue triturado en un tubo Eppendorf (1,7 ml) con un pistilo e incubado 1 h a 65°C en 0,5 ml de buffer de extracción (0,1 M Tris-Cl pH 8,0; 0,05 M EDTA pH 8,0; 0,5 M NaCl, 0,25 % SDS, 0,7% 2-Mercaptoetanol). Cuando se usó micelio liofilizado, se tomó de 10-15 mg de tejido y se agitó en 0,5 ml del buffer de extracción. Luego se agregó 1 vol (0,5 ml) de fenol:cloroformo:isoamilalcohol 25:24:1 y se mezcló por inversión 5 min o hasta formar una emulsión. Fue centrifugado 3 min a 13200 rpm y el sobrenadante fue transferido a otro tubo agregando 1 vol de cloroformo: isoamilalcohol 24:1. De nuevo se mezcló y centrifugó pasando el sobrenadante a otro tubo y precipitando el ADN con 1/10 vol de NH<sub>4</sub>OAc y 2 vol de etanol frío. Se incubó a -20°C por 30 min y luego se centrifugó. El pelet fue resuspendido en 100 µl de TE (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) y se incubó a 37°C por 30 min con 1 µl de ARNasa (10 mg ml<sup>-1</sup>). Para purificar el ADN, se agregó 300 µl de TE, se repitió los lavados con fenol:cloroformo y la precipitación con etanol. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 100 µl de TE y la calidad de este fue determinada por

electroforesis en un buffer TBE 0,5 X (0,045 M Tris-Borato, 0,001 M EDTA pH 8,0) usando un gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio (0,3 µg ml<sup>-1</sup>). La cuantificación de ADN se llevó a cabo con un fluorómetro. Finalmente, las soluciones de ADN fueron diluidas a una concentración final de 4 ng µl<sup>-1</sup> y almacenadas a -20°C.

### Marcadores moleculares

Para el presente estudio fueron utilizados 60 imprimadores de secuencia arbitraria de las series OPAM, OPB y OPC (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, U.S.A.), los cuales fueron inicialmente evaluados en 8 aislamientos de *P. infestans*, que comprendían tanto aislamientos resistentes como sensibles al metalaxyl y provenientes de las diferentes zonas productoras de papa. Producto de esta prueba inicial fueron seleccionados 11 imprimadores (Cuadro 1). Estos imprimadores amplificaron bandas polimórficas y de fácil determinación. Posteriormente, los 62 aislamientos de *P. infestans* fueron evaluados con los 11 imprimadores seleccionados.

Cuadro 1. Identificación y secuencia de los imprimadores usados, número de loci y número de polimorfismos producidos por los RAPDs en aislamientos de *Phytophthora infestans*.

Imprimador	Secuencia 5' → 3'	Número de loci	Número de polimorfismos
OPAM-07	AACCGCGGCA	14	12
OPAM-09	TGCCGGTTCA	8	7
OPAM-14	TGGTTGCGGA	7	3
OPB-05	TGCGCCCTTC	4	2
OPB-07	GGTGACGCAG	12	7
OPB-11	GTAGACCCGT	4	2
OPB-12	CCTTGACGCA	6	3
OPB-17	AGGGAACGAG	7	2
OPC-02	GTGAGGCGTC	6	3
OPC-08	TGGACCGGTG	4	3
OPC-10	TGTCTGGGTG	7	1
Total		79	45 (57) <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Porcentaje total de polimorfismos.

Con el fin de determinar la relación genética de los aislamientos costarricenses con otras poblaciones, se incluyó en el análisis una muestra de los aislamientos US-1, US-18 y EC-1, para un total final de 65 aislamientos.

La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador GeneProfile® PCR System 9700, siguiendo un protocolo modificado de Williams *et al.* (1990). La reacción se realizó en un volumen de 25  $\mu$ l conteniendo 10 mM Tris-Cl pH 9,0; 50 mM KCl, 0,1% Triton® X-100, 100  $\mu$ M de cada uno de los nucleótidos: dGTP; dATP; dCTP; y dTTP; 0,25  $\mu$ M de imprimador, 255 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U taq ADN polimerasa y 20 ng de ADN. Inicialmente, las reacciones se incubaron a 94°C por 30 s; y luego se realizaron 45 ciclos a 94°C por 1 min (desnaturalización), 35°C por 1 min (alineamiento), 72°C por 2 min (extensión); y 72°C por 5 min (extensión final). Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% con 0,3  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio, un buffer TBE 0,5 X, y visualizados con luz UV. Las amplificaciones de cada aislamiento se llevaron a cabo 2 veces con ADN de 2 extracciones independientes.

Para el análisis de las bandas, los geles fueron fotografiados con una cámara Polaroid (película 667). Los fragmentos no reproducibles fueron descartados.

### Análisis de la diversidad genética

La relación genética entre los aislamientos fue determinada mediante el análisis de los RAPDs, con el uso de diferentes coeficientes de diversidad. Para el análisis de los datos se asumió que los RAPDs son marcadores dominantes y que la población estudiada no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. Inicialmente, se construyó un dendrograma basado en una matriz de distancias genéticas según Nei (1972), mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Groups using Arithmetic Averages, por su siglas en inglés). Se determinó la diversidad genética según Nei (1972) para los aislamientos US-1, US-18 y EC-1 como una población foránea, y para la población

costarricense. Los aislamientos de cada región geográfica y de cada nivel de resistencia, fueron separados como subpoblaciones individuales, con el fin de determinar el efecto de cada una de estas variables mediante el coeficiente de diferenciación genética en poblaciones subdivididas ( $G_{st}$ ), el cual fue calculado como lo describe Nei (1973).

## RESULTADOS

### Amplificaciones

Los patrones generados por los RAPDs en los 62 aislamientos costarricenses de *P. infestans* y las 3 accesiones externas (US-1, US-18 y EC-1), usando los 11 imprimadores; mostraron polimorfismos entre las 65 muestras evaluadas. En total se obtuvo 79 fragmentos amplificados, de los cuales el 57% (45 fragmentos) fue polimórfico (Cuadro 1).

El patrón de bandas observado entre los aislamientos costarricenses -como un solo grupo- y las accesiones externas -como otro grupo- no fue muy diferente, la principal diferencia entre todas las muestras radicó en la presencia o ausencia de algunas bandas. La figura 1 muestra los patrones de bandas de ADN de los aislamientos

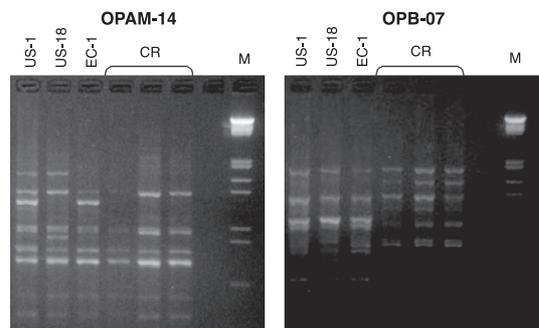


Fig. 1. Productos de amplificación de ADN de diferentes aislamientos de *Phytophthora infestans*. US-1 y EC-1: aislamientos provenientes de Ecuador. US-18: aislamiento proveniente de Carolina del Norte, EE.UU. CR: aislamientos costarricenses. M: marcador Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*.

foráneos y de algunos aislamientos costarricenses con los imprimadores OPAM-14 y OPB-07.

### Diversidad genética

El dendrograma de distancias genéticas, construido con los datos generados por los RAPDs, muestra como la mayor distancia genética ocurre entre los aislamientos costarricenses y las accesiones foráneas US-1, US-18 y EC-1 (Figura 2). Dentro del grupo de accesiones externas, los aislamientos US-1 y US-18 mostraron una relación más cercana entre sí con respecto al aislamiento EC-1. Por otro lado, entre los aislamientos costarricenses no se observó ninguna forma de agrupación definida en el dendrograma. Por lo tanto, todos aquellos aislamientos genéticamente iguales formaron un mismo grupo.

Entre la población de aislamientos costarricenses se observó 17 genotipos, los cuales variaron en frecuencia de 0,55 a 0,02. El genotipo más frecuente fue el constituido por los aislamientos del grupo RAPD 1 (Figura 2). Este genotipo se encontró en todas las zonas y durante los 3 años de recolección. El genotipo del grupo RAPD 17 (aislamiento 4) fue un aislamiento extraño, no sólo por su baja frecuencia, sino también por mostrar la mayor distancia genética respecto al resto de los aislamientos locales.

Toda la población de aislamientos costarricenses fue agrupada en sub-poblaciones hipotéticas de acuerdo al nivel de resistencia y zona de producción (Cuadro 2). El coeficiente de diferenciación genética  $G_{st}$  (Cuadro 2), fue utilizado para estimar la partición de la diversidad genética total de la población en diversidad dentro de la

Cuadro 2. Diversidad y diferenciación genética entre poblaciones y sub-poblaciones de *Phytophthora infestans* estimada con RAPDs.

Componente	Población	$H_s$	$H_t$	$D_{st}$	$G_{st}$
País					
	Foráneos <sup>a</sup> (n=3)	0,1230			
	Costarricenses (n=62)	0,0740			
	<b>Todos</b> (n=65)	<b>0,0985<sup>b</sup></b>	0,1964	0,0979	<b>0,4984 (50%)</b>
Zona					
	Cartago (n=39)	0,0485			
	Zarcero (n=16)	0,1073			
	Heredia (n=4)	0,0000			
	Fraijanes (n=3)	0,0188			
	<b>Todos</b> (n=62)	0,0437	0,0556	0,0120	<b>0,2153 (22%)</b>
Metalaxyl					
	Resistente (n=43)	0,0883			
	Sensible (n=19)	0,0426			
	<b>Todos</b> (n=62)	0,0655	0,0695	0,0040	<b>0,0578 (6%)</b>

<sup>a</sup>Comprende los aislamientos US-1, US-18 y EC-1.

$H_s$ : Diversidad genética dentro de cada sub-población.

<sup>b</sup>Promedio de la diversidad genética dentro de cada sub-población.

$H_t$ : Diversidad genética total de cada población ( $H_s + D_{st}$ ).

$D_{st}$ : Diversidad genética entre sub-poblaciones.

$G_{st}$ : Coeficiente de diferenciación genética en poblaciones subdivididas ( $D_{st}/H_t$ ).

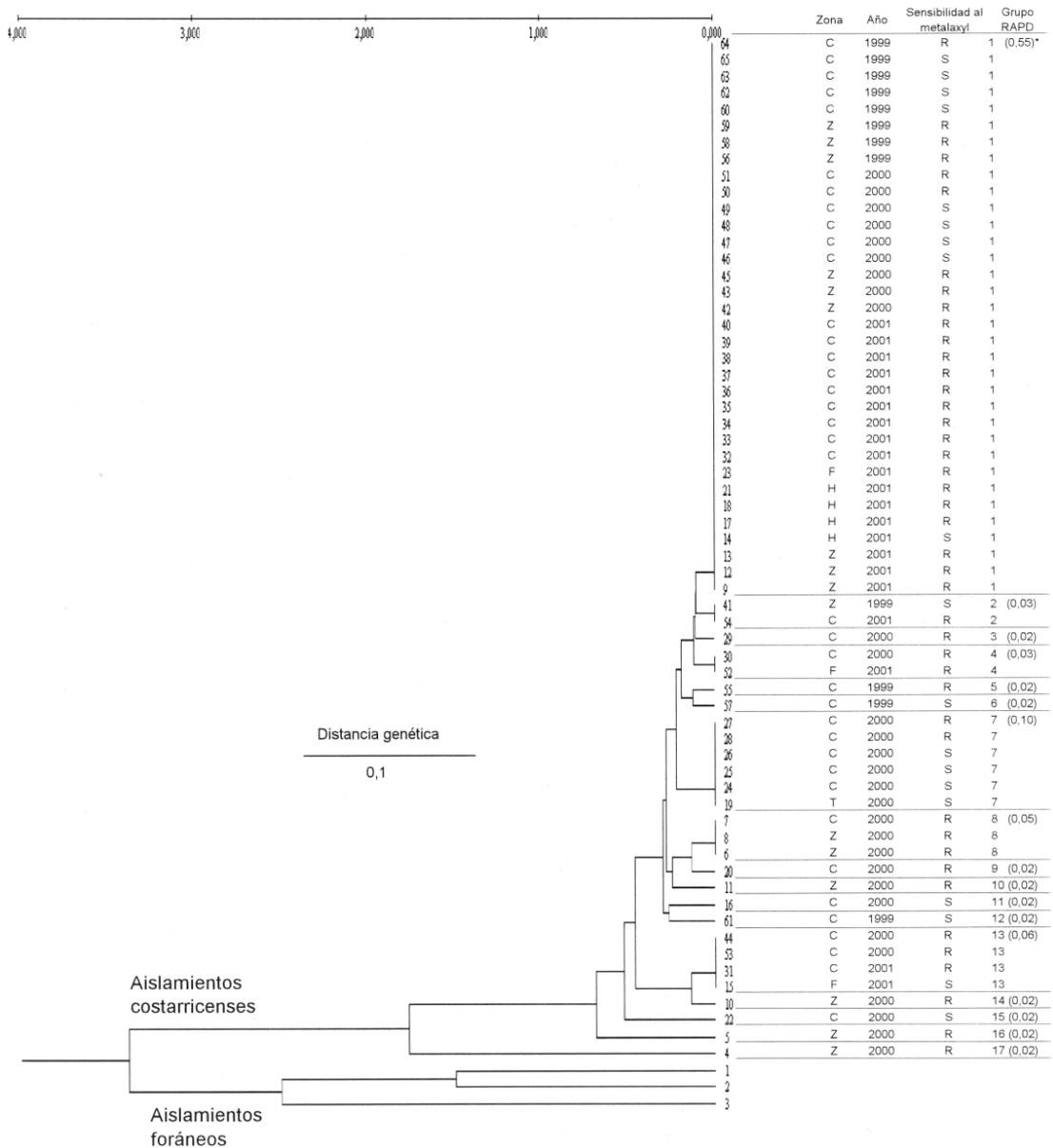


Fig. 2. Dendrograma generado con las distancias genéticas de Nei (1972), obtenidas a partir de RAPDs. 1: US-1. 2:US-18. 3: EC-1. 4-65: Aislamientos costarricenses. C: Cartago. Z: Zarcero. F: Fraijanes. H: Heredia. T: Tres Rios. R: Resistente. S: Sensible. \*Frecuencia del genotipo.

sub-población y diversidad entre sub-poblaciones. Este coeficiente mostró que la mayor diversidad se encuentra entre los aislamientos de *P. infestans*, y no entre las sub-poblaciones, es decir, no se observó una sub-estructuración de la población

con respecto a la zona de producción o al nivel de resistencia al metalaxyl. Cuando los aislamientos se agruparon de acuerdo a las 4 zonas (Cartago, Zarcero, Fraijanes y Heredia), el 22% de la diversidad total fue atribuido al hecho de que los

aislamientos proceden de lugares diferentes mientras que el 78% de la diversidad restante es atribuido a diferencias entre los individuos de cada zona. Cuando los aislamientos se agruparon de acuerdo al nivel de resistencia al fungicida metalaxyl; sólo el 6% de la diversidad total fue atribuido al nivel de resistencia al fungicida y el restante 94% de la diversidad se atribuyó a diferencias entre aislamientos.

Al comparar la población costarricense de aislamientos de *P. infestans* con las accesiones foráneas (US-1, US-18, y EC-1) como una población aparte, se observó que el 50% de la diversidad corresponde a diferencias entre ambas poblaciones.

La diversidad genética de Nei (1973) (valor  $H_t$  del cuadro 2, cuyo valor máximo es 1) fue utilizada para estimar: la diversidad de los aislamientos foráneos como una población externa; la diversidad de la población costarricense; la diversidad de las subpoblaciones hipotéticas divididas de acuerdo a la zona de producción; y el nivel de resistencia al metalaxyl. Los aislamientos US-1, US-18 y EC-1 mostraron mayor diversidad genética que la población costarricense. Dentro de la población costarricense, los aislamientos de Zarcero y Fraijanes mostraron mayor diversidad genética que los aislamientos de Cartago y Heredia. A su vez, los aislamientos resistentes al metalaxyl mostraron mayor diversidad genética que los aislamientos sensibles.

## DISCUSIÓN

La diversidad genética de la población de *P. infestans* fue demostrada por el análisis de los patrones generados por los RAPDs en cada uno de los aislamientos, encontrándose una alta diversidad de genotipos (Figura 1). Estos datos corresponden a una población específica en el tiempo y lugar; particularmente, la población equivale a la suma de todos los aislamientos recolectados entre los años 1999 y 2001, en plantaciones de papa en las zonas de Cartago, Zarcero, Fraijanes y Heredia. Esto concuerda con lo expresado por Williams *et al.* (1990), quienes indican que

la diversidad genética revelada por los RAPDs muestra la variación genética distribuida a través del genoma de los individuos y no necesariamente la variación de loci particulares. Así, los RAPDs brindan información valiosa para la diferenciación de linajes clonales en patógenos que se reproducen asexualmente (McDonald 1997).

La fuente que genera esta diversidad genética en la población del patógeno puede estar dada por 3 factores principales: el flujo de genes; la recombinación sexual o asexual; y las mutaciones (Burdon y Silk 1997). Probablemente, la recombinación asexual y las mutaciones han sido los factores que más han contribuido a esta diversidad, ya que el flujo de genes, interpretado como un fenómeno migratorio de un país a otro, es de poca consideración en este estudio. Los aislamientos costarricenses se encuentran como un grupo totalmente separado de los aislamientos US-1, US-18 y EC-1, y a su vez, estos se encuentran más relacionados genéticamente entre sí (Figura 1).

El aislamiento US-1 ha sido descrito como un genotipo de las “poblaciones viejas” de *P. infestans* distribuido mundialmente (tipo de apareamiento A1, sensible al fungicida metalaxyl, pocos factores de virulencia, haplotipo mtADN Ib y un patrón característico de aloenzimas y RFLP-RG57); sin embargo, han aparecido diferentes variantes del US-1 dando origen a poblaciones que se derivaron asexualmente a partir de un ancestro común (Goodwin *et al.* 1994). Por otro lado, el US-18 es un genotipo descrito en EE.UU., recolectado por primera vez en 1994 de plantaciones de tomate en Tennessee y Carolina del Norte, y ha sido el único genotipo recobrado exclusivamente de plantaciones de tomate en Carolina del Norte desde 1995 (Fraser *et al.* 1999, Wangsomboondee *et al.* 2002). Este genotipo se considera como de las “poblaciones nuevas”, es del tipo de apareamiento A2 y es sensible o con resistencia intermedia al metalaxyl, haplotipo mtADN Ia y con un patrón RFLP-RG57 diferente al US-1; además, se cree que se originó por recombinación sexual entre el genotipo US-1 y el US-8 (Wangsomboondee *et al.* 2002). Cabe señalar que el genotipo US-8, de tipo de apareamiento A2, resistente al metalaxyl

y haplotipo mtADN Ia, es también un genotipo de las “nuevas poblaciones” que se encuentra distribuido de forma general en las plantaciones de papa en Norteamérica (Goodwin *et al.* 1998). Se cree que el genotipo US-8 ingresó a EE.UU. desde el Norte de México (Goodwin *et al.* 1996). El genotipo EC-1 también considerado como de las “poblaciones nuevas”, es del tipo de apareamiento A1 y con diferentes niveles de resistencia al metalaxyl (Forbes *et al.* 1997). Este genotipo es predominante en los Andes especialmente Ecuador y Perú, donde ha desplazado al genotipo US-1 de las plantaciones de papa. También ha sido detectado en Colombia y Venezuela (Forbes *et al.* 1997, Oyarzun *et al.* 1998, Pérez *et al.* 2001). Resulta interesante notar como los genotipos US-18 y EC-1 de las llamadas “poblaciones nuevas” muestran mayor relación genética con el genotipo US-1 de las “poblaciones viejas”, que fue el genotipo dominante en la mayoría de lugares del mundo (Goodwin *et al.* 1994).

Con base en estas características los 3 aislamientos se toman como representantes de una población foránea, el indicador de diferenciación genética  $G_{st}$  entre esta población foránea y la población costarricense es de 0,4984, lo que corresponde a poblaciones con un alto grado de diferenciación genética. El  $G_{st}$  también ha sido utilizado en otras ocasiones para diferenciar poblaciones de *P. infestans*. Goodwin *et al.* (1994) consideraron que poblaciones de *P. infestans* con  $G_{st}=0,07$  fueron genéticamente similares, mientras que aquellas con  $G_{st}=0,32$  fueron moderadamente diferentes. Otros autores también han señalado que las diferencias generadas por los RAPDs, según la región geográfica, indican que ha existido poco o ningún movimiento del patógeno de un lugar a otro (Carlisle *et al.* 2001). Esto nos lleva a concluir que el flujo de genes, desde las poblaciones nuevas o viejas, aparentemente no es una fuente de diversidad que haya actuado sobre la población costarricense de *P. infestans*.

El concepto de migraciones no es muy aplicable a *P. infestans* en Costa Rica, ya que al igual que en este estudio, Goodwin *et al.* (1994) y Sánchez *et al.* (2000) tampoco lograron establecer

una relación genética entre aislamientos de Costa Rica con aislamientos de otros países. Incluso, Sánchez *et al.* (2000) consideraron que los aislamientos que ellos evaluaron podrían corresponder a migraciones particulares desde México, en los que no estuvieron involucrados los llamados viejos o nuevos aislamientos.

Gómez *et al.* (2004) evaluaron 73 aislamientos recolectados del año 2000 al 2004 en plantaciones de papa en Cartago, Zarcero, Fraijanes y Heredia. Los 73 aislamientos evaluados pertenecieron a un solo genotipo según el tipo de apareamiento, aloenzimas *Gpi* y *Pep*, haplotipos mtADN y patrones RFLP-RG57; siendo este único genotipo muy parecido al descrito inicialmente por Goodwin *et al.* (1994) y Sánchez *et al.* (2000); sin embargo, no pudieron clasificar los aislamientos recolectados de plantaciones de papa en Costa Rica como nuevos o viejos, aunque ellos sugieren que los aislamientos son más parecidos a las poblaciones nuevas, emigrantes desde México a finales de la década de 1970. En este sentido, Gómez *et al.* (2004) proponen que el ancestro de la población actual, recolectado en plantaciones de papa, pudo ingresar desde México, Norte o Sudamérica antes de finales de la década de los 70s.

Si la población actual estudiada tuvo origen de una migración en el pasado, entonces Costa Rica no se encuentra en la ruta descrita para las más famosas migraciones de *P. infestans* alrededor del mundo en los años 1840s y 1970s, las cuales consideran a México como punto de partida del patógeno hacia Norteamérica y Europa, y luego de Europa al resto del mundo (Fry *et al.* 1993, Goodwin *et al.* 1994, Goodwin 1997). Otros autores señalan que *P. infestans* pudo estar distribuida en América y Europa antes de 1840 (Abad y Abad 1997), y que el genotipo US-1 no fue el único genotipo en Europa en esa época (Ristaino *et al.* 2001). Es importante recalcar que cualquier inmigración de *P. infestans* a Costa Rica pudo haber ocurrido antes de la entrada en vigencia del Programa Nacional de Certificación de Semilla de Papa a inicios de la década de 1980, el cual prohíbe la importación

de tubérculos de papa para semilla. Este hecho pudo haber limitado la introducción de nuevos genotipos al país (Gómez *et al.* 2004).

Descartando el flujo de genes como una fuente reciente de la variación genética y en ausencia del tipo de apareamiento A2 de la población estudiada, las mutaciones y la recombinación asexual vienen a ser las fuentes activas de diversidad. Las mutaciones causadas por deleciones, inserciones o translocaciones son una fuente primaria de variación genética y, aunque no se tiene información precisa sobre la tasa de mutación en *P. infestans*, estas serían frecuentes en una epidemia de tizón tardío. Una sola lesión de *P. infestans* puede producir cientos de miles de esporangios en ciclos de 4-7 días (Erwin y Ribeiro 1996); la tasa de multiplicación podría ser aún mayor si las condiciones son favorables para la producción de zoosporas, ya que un esporangio puede producir entre 6 y 12 zoosporas (Erwin y Ribeiro 1996). No obstante, no es necesaria una alta tasa de mutación para explicar algún cambio genético (Goodwin 1997).

La recombinación asexual como la recombinación mitótica o parasexualismo, son fenómenos que generan diversidad y han sido propuestos para explicar cambios genéticos en poblaciones clonales de *P. infestans*. La recombinación mitótica no comprende la generación de nuevos alelos, en muchos casos lo que sucede es que aparecen cambios de loci heterocigotos a loci homocigotos; además, este fenómeno puede mostrar la variación recesiva que previamente estaba oculta en forma heterocigota, lo que significa la pérdida de una banda en el análisis de patrones de ADN e indica un polimorfismo (Goodwin 1997). Otra explicación potencial de la variación nueva en linajes clonales de *P. infestans* es la recombinación parasexual, y aunque es una probabilidad, no es la explicación más frecuente para la mayoría de los cambios observados.

En general, todos los miembros de un linaje clonal son descendientes de un solo individuo y cualquier variación en el linaje debe originarse por mutación o recombinación asexual (Goodwin 1997). Variantes del genotipo US-1, identificados

como US-1.1, difieren del patrón RFLP-RG57 sólo en una banda (Goodwin *et al.* 1994). Lo mismo sucede para el EC-1 y sus variantes, las cuales difieren en sólo una banda (Forbes *et al.* 1997). Recientemente, Abu-El Samen *et al.* (2003 a y b) han mostrado la variación genética a nivel de virulencia y marcadores RAPD y AFLP en progenies asexuales de *P. infestans*, provenientes del cultivo de zoosporas de un solo aislamiento. Los resultados de estos autores sugieren que hay un gran nivel de variación genética en progenies asexuales, no sólo a nivel de características fenotípicas, sino también a nivel de regiones no codificantes del genoma, originadas por mutación y recombinación mitótica. En este estudio los aislamientos costarricenses evaluados se encuentran muy relacionados genéticamente entre sí, de manera que los cambios observados en los patrones generados por los RAPDs, formaron 17 genotipos, los cuales probablemente se originaron por mutación y recombinación asexual a partir de un ancestro común.

La estructura de las poblaciones de *P. infestans* se ha realizado caracterizando los aislamientos según las razas fisiológicas, la resistencia al fungicida metalaxyl, los tipos de apareamiento, las aloenzimas *Gpi* y *Pep*, los haplotipos mtADN y los RFLP-RG57 (Forbes *et al.* 1998). En años más recientes los RAPDs, los AFLPs y los microsatélites han ayudado a dilucidar con mayor precisión la estructura poblacional de *P. infestans*, así como su diversidad genética. Por ejemplo, usando RAPDs se ha logrado determinar nuevos genotipos dentro de un mismo linaje clonal, previamente caracterizado por el tipo de apareamiento, la resistencia al metalaxyl, aloenzimas y RFLP-RG57 (Punja *et al.* 1998, Muhuku *et al.* 2000, Ghimire *et al.* 2003). En el 2001, Pérez *et al.* lograron determinar, con el uso de AFLPs, 17 genotipos a partir de 98 aislamientos evaluados, mientras que esos mismos aislamientos fueron separados sólo en 8 genotipos con RFLP-RG57. Además, con el uso de los RAPDs se ha logrado observar con facilidad, polimorfismos en aislamientos de *P. infestans*, usando diferentes imprimadores (Punja *et al.* 1998, Mahuku *et al.* 2000, Carlisle *et al.* 2001, Daayf *et al.*

2001). En nuestro estudio fueron determinados 17 grupos RAPD a partir de los 62 aislamientos analizados; los cuales difieren en frecuencia. Si se asume que esta población es prácticamente idéntica a la población evaluada por Gómez *et al.* (2004), debido a que se recolectaron en períodos parecidos (1999-2001 y 2000-2004) y en las mismas zonas de producción de papa; entonces, el estudio con RAPDs logró determinar diferentes genotipos, los cuales pueden ser un único genotipo de acuerdo a los marcadores tradicionales. Todos los aislamientos evaluados por Gómez *et al.* (2004) presentaron el mismo patrón RFLP-RG57 para el análisis de ADN. Este resultado no es sorprendente si se considera que la población es de propagación asexual y tiene un ancestro en común, ya que el uso de RFLP-RG57 resulta en una prueba muy estable bajo estas condiciones y muestra muy poco o ninguna segregación entre progenies asexuales de zoosporas provenientes de un solo aislamiento (Goodwin *et al.* 1992, Abu-El Samen *et al.* 2001a). Consecuentemente, los polimorfismos generados por los RAPDs entre aislamientos monomórficos para RFLPs, indican que la variación genética se ha originado por mutación (Ghimire *et al.* 2003).

En este estudio, el genotipo predominante es el del grupo 1 (Figura 2), el cual incluye el 52% de los aislamientos. El resto de los genotipos se encontró en frecuencias mucho más bajas (10-2,1%). Si tomamos en cuenta que en los grupos analizados con los RAPDs hay aislamientos tanto sensibles como resistentes al fungicida metalaxyl dentro de un mismo grupo, la estructura de la población sería más compleja.

La diferenciación genética de la población costarricense dividida en componentes (Cuadro 2), muestra como la mayor diversidad se encuentra entre los aislamientos. La zona geográfica y el fungicida metalaxyl no son factores que afecten en gran medida la diversidad. Sin embargo, la mayor diferenciación genética se da entre los aislamientos de Cartago y los de Zarcero, donde el 22% de la diversidad genética en estos aislamientos es explicado por su procedencia. Como describen Páez *et al.* (2001), en Zarcero fue donde se encontró una

mayor frecuencia de aislamientos resistentes, pero esto no indica que el fungicida sea el responsable de esta diferenciación genética, ya que aislamientos resistentes y sensibles al metalaxyl se ubicaron dentro de un mismo grupo de RAPDs y, sólo un 6% de la diversidad genética de los aislamientos corresponde al hecho de que sean resistentes o sensibles. Otros factores como el clima, las prácticas culturales, las variedades cultivadas en la zona, así como la interacción del patógeno con otros hospederos, pueden haber actuado como inductores de cambios genéticos. También, la movilidad de tubérculos de papa tomada en cuenta como un medio de transporte de inóculo de Cartago hacia Zarcero, pudo influir en que la diferenciación entre ambas poblaciones sea baja.

La complejidad de esta población de *P. infestans* en papa, aún siendo de propagación asexual, también ha sido observada mediante estudios de las razas fisiológicas. En otros estudios realizados en Costa Rica (Miguel Barquero 2004, Comunicación Personal), se encontró 37 patotipos entre 40 aislamientos recolectados principalmente en Cartago y Zarcero, determinando diferencias entre la frecuencia de aparición, la diversidad y el número de cada factor de virulencia según la localidad. Todo esto parece indicar que los cambios genéticos en la población asexual son muy activos; así, las estrategias de control de la enfermedad deberán ser enfocadas hacia una población de patógenos y no hacia uno o pocos individuos, aunque estos correspondan a linajes clonales. Entender la estructura de las poblaciones en cuestión ayuda a predecir cómo la población del patógeno se desenvolverá en respuesta a las prácticas de control (McDonald 1997).

Siguiendo el principio de población, en el primer intento por determinar la estructura poblacional de *P. infestans* en el cultivo de la papa en Costa Rica, se encontró poblaciones resistentes y sensibles al fungicida metalaxyl (Páez *et al.* 2001). Posteriormente, se determinó que sólo el tipo de apareamiento A1 estaba presente en esta población, por lo que se asumió que la población está formada por linajes clonales que se reproducen asexualmente (Páez *et al.* 2004).

Por último, con el análisis con los RAPDs se demuestra la plasticidad del patógeno para cambiar y formar linajes clonales, los cuales difieren en su frecuencia. De esta manera, se asume que la estructura de la población de *P. infestans* recolectada en el cultivo de papa, consiste de linajes clonales relacionados genéticamente entre sí. Esta relación se originaría a través de un proceso de reproducción asexual de un ancestro común, el cual podría ser diferente al origen que pueden tener otras poblaciones de *P. infestans* alrededor del mundo (Goodwin 1997). Según los resultados de este estudio y en comparación con los resultados de Goodwin *et al.* (1994), Goodwin *et al.* (1997), Sánchez *et al.* (2000), Gómez *et al.* (2004), se plantea la hipótesis de que las poblaciones actuales de *P. infestans*, en plantaciones de papa en Costa Rica, son poblaciones establecidas de propagación asexual, que tuvieron un ancestro en común, el cual no es semejante a aquellos individuos que son denominados como aislamientos viejos o nuevos. La fijación de esta población se ha dado probablemente antes o a partir de la prohibición de importar, desde otros países, tubérculos de papa para semilla a finales de los años 70s e inicio de los 80s. Así que, en los últimos 20 años los cambios genéticos que ha sufrido el patógeno en las plantaciones de papa han ocurrido por mutación, recombinación mitótica o ambas. Si todo lo anterior se mantiene, entonces también se mantiene la hipótesis presentada por Páez *et al.* (2001), la cual señala que la resistencia al fungicida metalaxyl se originó a partir de una población sensible inicial donde el fungicida actuó como el factor de selección.

Esta investigación tiene grandes repercusiones prácticas, ya que pone de manifiesto la importancia de las prácticas culturales para el manejo del tizón tardío, en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad, como un factor que induce al patógeno a cambiar.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Comisión Europea a través del proyecto INCO-DC:

“Exploitation of the genetic biodiversity of wild relatives for breeding potatoes with sustainable resistance to late blight (*Phytophthora infestans*)”.

### LITERATURA CITADA

- ABAD Z.G., ABAD J.A. 1997. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of South America. *Plant Disease* 81 (6): 683-688.
- ABU-EL SAMEN F.M., SECOR G.A., GUDMESTAD N.C. 2003a. Genetic variation among asexual progenies of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers. *Plant Pathology* 52: 314-325.
- ABU-EL SAMEN F.M., SECOR G.A., GUDMESTAD N.C. 2003b. Variability in virulence among asexual progenies in *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Phytopathology* 93 (3): 293-304.
- BURDON J.J., SILK J. 1997. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology* 87: 664-669.
- CARLISLE D.J., COOKE L.R., BROWN A.E. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 291-303.
- CATEN C.E., JINKS J.L. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. *Canadian Journal of Botany* 46: 329-348.
- COHEN Y. 2002. Populations of *Phytophthora infestans* in Israel underwent three major genetic changes during 1983 to 2000. *Phytopathology* 92 (3): 300-307.
- DAAYF F., (BUD) PLATT H.W., MAHUKU G., PETERS, R.D. 2001. Relationships between pathotypes and RAPDs, gpi-allozyme patterns, mating types, and resistance to metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. *American Journal of Potato Research* 78: 129-139.
- DOWLEY L.J., O'SULLIVAN E., GRIFFIN D., HARMEY M. 2000. Genetic analysis of Irish populations of *Phytophthora infestans*. Teagasc, Agriculture and Food Development Authority. 15 p.
- ERWIN D.C., RIBEIRO O.K. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. APS. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- FORBES G.A., ESCOBAR X.C., AYALA, C.C., REVELO J., ORDOÑEZ M.E., FRY B.A., DOUCETT K., FRY W.E. 1997. Population genetic structure of

- Phytophthora infestans* in Ecuador. *Phytopathology* 87: 375-380.
- FORBES G.A., GOODWIN S.B., DRENTH A., OYARZUN P., ORDOÑEZ M.E., FRY W.E. 1998. A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 82: 811-818.
- FRASER D.E., SHOEMAKER P.B., RISTAINO J.B. 1999. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from tomato and potato in North Carolina from 1993 to 1995. *Plant Disease* 83: 633-638.
- FRY W.E., GOODWIN S.B., DYER A.T., MATUSZAK J.M., DRENTH A., TOOLEY P.W., SUJKOWSKI L.S., KOH Y.J., COHEN B.A., SPIELMAN L.J., DEAHL L., INGLIS D.A., SANDIAN K.P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77: 653-661.
- GAVINO P.D., SMART C.D., SANDROCK R.W., MILLER J.S., HAMM P.B., YUN LEE T., DAVIS R.M., FRY W.E. 2000. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: Generation of an aggressive lineage. *Plant Disease* 84: 731-735.
- GHIMIRE S.R., HYDE K.D., HODGKISS I.J., SHAW D.S., LIEW E.C.Y. 2003. Variations in the *Phytophthora infestans* populations in Nepal as revealed by nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms. *Phytopathology* 93 (2): 236-242.
- GISI U., COHEN Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology* 34: 549-572.
- GÓMEZ L., CAFÉ-FILHO A.C., BRENES A., RISTAINO J.B. 2004. Genetic structure of *Phytophthora infestans* in Costa Rica. En revisión.
- GOODWIN S.B., DRENTH A., FRY W.E. 1992. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Current Genetics* 22: 107-115.
- GOODWIN S.B., COHEN B.A., FRY W.E. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academic Sciences (USA)* 91: 11591-11595.
- GOODWIN S.B., SUJKOWSKI L.S., FRY W.E. 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology* 86: 793-800.
- GOODWIN, S.B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87 (4): 462-473.
- GOODWIN S.B., DRENTH A. 1997. Origen of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology* (10): 992-999.
- GOODWIN S.B., SMART C.D., SANDROCK R.W., DEAHL K.L., PUNJA Z.K., FRY W.E. 1998. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: Role of migration and recombination. *Phytopathology* 88(9): 939-949.
- HOHL H.R., ISELIN K. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behavior. *Transactions of British Mycological Society* 83: 529-530.
- KNAPOVA G., GISI U. 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* 51: 641-653.
- KOH Y.J., GOODWIN S.B., DYER A.T., COHEN B.A., OGOSHI A., SATO N., FRY W.E. 1994. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries. *Phytopathology* 84: 922-927.
- LEE S.B., TAYLOR J.W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.) Academic. USA. 482 p.
- MAHUKU G.S., GOODWIN P.H., HALL R., HSIANG T. 1997. Variability in the highly virulent type of *Leptosphaeria maculans* within and between oil-seed rape fields. *Canadian Journal of Botany* 75: 1485-1492.
- MAHUKU G.S., PETERS R.D., PLATT H.W., DAAYF F. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994 to 1996. *Plant Pathology* 49: 252-260.
- MCDONALD B.A. 1997. The population genetic of fungi: Tools and techniques. *Phytopathology* 87 (4): 448-453.
- MCLEOD A., DENMAN S., SADIE A., DENNER F.D.N. 2001. Characterization of South African isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 85 (3): 287-291.
- NEI M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106 (949): 283-292.

- NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academic Sciences (USA) 70 (12): 3321-3323.
- OCHWO M.K.N., KAMOUN S., ADIPALA E., RUBAIHAYO P.R., LAMOUR K., OLANYA M. 2002. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the eastern and western highlands of Uganda. Journal of Phytopathology 150: 541-542.
- OYARZUN P.J., POZO A., ORDOÑEZ M.E., DOUCETT K., FORBES G.A. 1998. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. Phytopathology 88 (3): 265-271.
- PÁEZ O., GÓMEZ L., BRENES A., VALVERDE R. 2001. Resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxyl en el cultivo de la papa en Costa Rica. Agronomía Costarricense 25 (1): 33-44.
- PÁEZ O., VALVERDE R., GÓMEZ L., BRENES A. 2004. Determinación del tipo de apareamiento con marcadores moleculares en aislamientos de *Phytophthora infestans* recolectados en plantaciones de papa en Costa Rica. Agronomía Costarricense 28 (2): 9-16.
- PÉREZ, W.G., GAMBOA, S., FALCON, Y.V., COCA, M., RAYMUNDO, R.M., NELSON, R.J. 2001. Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 91 (10): 956-965.
- PUNJA Z. K., FÖRSTER H, CUNNINGHAM I., COFFEY M. D. 1998. Genotypes of the late blight pathogen (*Phytophthora infestans*) in British Columbia and other regions of Canada during 1993-1997. Canadian Journal of Plant Pathology 20: 274-282.
- RISTAINO J.B., GROVES C.T., PARRA G.R. 2001. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimen. Nature 411: 695-697.
- SÁNCHEZ V., SHATTOCK R.C., BUSTAMANTE E. 2000. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* nativos de Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas (CR) 55: 36-42.
- SEDEGUI M., CARROLL R.B., MOREHART A.L., EVANS T.A., KIM S.H., LAKHDAR R., ARIFI A. 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. Plant Disease 84: 173-176.
- TESTA A., CRISTINZIO G. 1999. Characterization of Italian strains of *Phytophthora infestans* with AFLP technique. 14<sup>th</sup> Conference "European Association for Potato Research". 2-7 maggio. Sorrento, Italia. p. 60.
- WANGSOMBOONDEE T., GROVES C.T., SHOEMAKER P.B., CUBETA M.A., RISTAINO J.B. 2002. *Phytophthora infestans* populations from tomato and potato in North Carolina differ in genetic diversity and structure. Phytopathology 92 (11): 1189-1195.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531-6535.
- ZHU J.H., WU N.F. 2001. Analysis of correlation between A2 mating type and DNA polymorphisms of *Phytophthora infestans* using RAPD. Journal of Agriculture University of Hebei 24 (2).

