



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

DIVERSIDAD MOLECULAR DE *Puccinia*
striiformis f. sp. hordei EN LA REGIÓN
NORTE DE AYACUCHO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

B. Sc. CESAR OBED COTERA HUAYHUA

LIMA – PERÚ

2016

JURADO EXAMINADOR:

Presidente: Dra. Patricia Herrera Velit

Secretario: Dr. Jorge Rodriguez Bailon

Vocal: Mg. Ana Colarossi Salinas

ASESOR: Dr. Carlos Gonzalo Merino Mendez

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres.

A mi madre por estar a mi lado en cada paso que doy, por cuidarme y protegerme, por apoyarme incondicionalmente y por todo el amor de madre que solo ella sabe darme.

A mi padre por inculcarme tantos buenos valores para caminar por la vida y por esa tan bella amistad que me brinda hasta hoy y todos los ánimos para seguir adelante con mucho cariño.

Por ellos quienes han sido el pilar de mi vida y velar por mi bienestar y mi educación continuamente, depositando su entera confianza en cada reto que me trazaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad.

Es por ellos que soy lo que soy ahora.

A ustedes, con amor.

César Coter Huayhua.

AGRADECIMIENTOS

Al FONDECYT/CONCYTEC, por apoyar mi formación profesional mediante el programa de beca de la cátedra CONCYTEC con mis estudios de Maestría.

A mi asesor de tesis, el Dr. Carlos Merino Mendez, por su acertada asesoría, por su comprensión, por todos los conocimientos brindados y su dirección en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Mg. Edgar Neyra Valdez, por sus enseñanzas y su guía en todos mis experimentos realizados en el laboratorio, durante el desarrollo de la tesis.

A los miembros de mi jurado por su comprensión y todos sus alcances, correcciones y consejos brindados para que este trabajo quede impecable.

A mi familia, quienes desde lejos siempre me han apoyado y cuidado por mi bienestar para culminar mis estudios.

A mi hermano Diego, quien siempre es un apoyo incondicional en seguir adelante y su aliento es fundamental en los momentos de flaqueza.

A Diana Martinez, por su compañía, por ayudarme, corregirme y apoyarme desde el inicio hasta el final con la redacción de la tesis, sin su guía y su cariño no se hubiera logrado.

A todos los miembros del laboratorio de la Unidad de Genómica, por esa amistad desinteresada y por su apoyo en el día a día del trabajo de laboratorio, en especial a mis amigos y compañeros de la Maestría: Olga Ponce, Maria Gonzales, Lorena Ramirez y José Chang Kee.

A Don RGB, que descansa en paz, quien siempre me sacó una sonrisa en los momentos más difíciles de la redacción de este manuscrito.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION	5
	2.1. Planteamiento del Problema	5
	2.2. Marco Teórico	6
	2.2.1. Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	6
	2.2.2. Roya Amarilla de Cebada (<i>Puccinia striiformis</i>)	9
	2.2.3. Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad	14
	2.2.4. Estimación de la Diversidad Genética	16
	2.2.5. Parámetros Genéticos Poblacionales	17
	2.2.6. Estructura y Diversidad Genética	20
	2.3. Justificación del Estudio	23
	2.4. Objetivos	27
III.	METODOLOGIA	28
	3.1. Material Biológico	28
	3.1.1. Colecta de Muestras	28
	3.1.2. Clasificación de Muestras	29
	3.2. Procedimiento Experimental	30
	3.2.1. Aislamiento de Esporas	30
	3.2.2. Extracción de ADN	31
	3.2.3. Cuantificación, visualización y dilución de ADN genómico	32
	3.2.4. PCR para amplificación del gen ITS	33
	3.2.5. Clonamiento y Secuenciamiento del gen ITS	36

3.2.6. Análisis Bioinformático	43
IV. RESULTADOS	46
4.1. Colecta de Material Biológico	46
4.2. Amplificación del Gen ITS en los Individuos	51
4.2.1. Aislamiento de urediniosporas	51
4.2.2. Extracción, cuantificación y dilución de ADN genómico	52
4.2.3. Amplificación de ITS	54
4.3. Clonamiento, Transformación y Secuenciamiento	55
4.3.1. Purificación, ligación y transformación de ITS	55
4.3.2. Selección de UFC transformadas	55
4.3.3. Extracción de plásmidos y secuenciamiento	56
4.4. Análisis Bioinformático	58
4.4.1. Alineamiento y composición de las secuencias	58
4.4.2. Estimación de las distancias genéticas	59
4.4.3. Estimación de la variabilidad genética	63
4.4.4. Análisis demográfico	65
4.4.5. Análisis de varianza molecular (AMOVA)	65
V. DISCUSIÓN	67
VI. CONCLUSIONES	83
VII. RECOMENDACIONES	84
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	85
IX. ANEXOS	104

RESUMEN

La cebada es el cuarto cereal más importante del mundo con alto valor nutricional después del arroz, el maíz y el trigo. La cebada es la principal materia prima para la industria panadera y cervecera. En el Perú, actualmente, la producción de cebada se debe en su mayoría a cultivos de pequeños agricultores, en zonas andinas, que utilizan el grano y sus derivados como alimento diario para su subsistencia.

La roya amarilla, es la mayor enfermedad que afecta los cereales y tiene una importancia económica a nivel mundial. Además de ser el principal motivo del retiro de variedades resistentes, a medida que aumenta el nivel de susceptibilidad de las mismas. En los últimos años a nivel mundial se ha avanzado en la resistencia a patógenos, a través del mejoramiento genético. No obstante, cabe señalar que la alta virulencia de este patógeno sigue causando inquietud, por ende, ha aumentado su estudio e importancia.

Esta tesis tiene como objetivo identificar molecularmente poblaciones diferenciales de *Puccinia striiformis* y determinar una primera aproximación de la diversidad genética y estructura poblacional de este patógeno de cebada para el Perú. Para este estudio, se colectaron 84 muestras de Roya Amarilla de Cebada de 5 provincias de la Zona Norte de Ayacucho, Perú, fueron examinados usando polimorfismos en secuencias de ADN. Se utilizó como marcador molecular secuencias de las regiones espaciadoras internas de transcripción (ITS) a partir de los genes ribosomales (ADNr). Se encontraron 6 haplotipos distribuidos en 2 poblaciones diferenciales: a) sub-población Norte agrupó 2 haplotipos y b) sub-población Centro agrupó 4 haplotipos.

Palabras Clave: *Hordeum vulgare L.*, *Puccinia striiformis*, Diversidad Genética,
Estructura Poblacional, internal transcribed spacer (ITS)

ABSTRACT

Barley is the fourth most important cereal in the world with high nutritional value after rice, maize and wheat. Barley is the main raw material for baking and brewing industry. In Peru, currently, the production of barley is mostly realized by small farmers in Andean areas, which using the grains and its derivatives as daily food for their subsistence.

Yellow rust, is the largest disease that affects cereals and has an economic importance worldwide, besides being the main reason for the withdrawal of resistant varieties, as it increases the level of susceptibility of them. In recent years, there have been major progresses in pathogen resistance by genetic improvement. However, it should be noted that the high virulence of this pathogen continues causing concern; therefore, increasing their study and importance.

The present study aimed to identify differential populations of *Puccinia striiformis*, as first approximation of genetic diversity and population structure of the pathogen of barley for Peru. For this study, were used 84 samples of barley yellow rust collected in 5 provinces of the north of Ayacucho (Peru) and were examined the polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) regions of the ribosomal DNA (rDNA). Six haplotypes were found in 2 differential populations: a) North sub-population grouping 2 haplotypes and b) Center sub-population grouping 4 haplotypes.

Key Words: *Hordeum vulgare* L., *Puccinia striiformis*, Genetic Diversity, Population Structure, Internal Transcribed Spacer (ITS)

I. INTRODUCCIÓN

La cebada (*Hordeum vulgare L.*) fue uno de los primeros cereales en ser domesticados, originarios de la antigua Mesopotamia y Persia hace ya 10.000 años. Hoy en día representa el cuarto cereal más abundante en la superficie cultivable y se siembra en regiones agroecológicas tan disímiles como el centro de Europa, Norte y sur de América y en regiones de Asia, África y Australia. (FAO, 2013). Aproximadamente tres cuartas partes de la producción mundial se utiliza para la alimentación animal, el 20% es malteada para su uso en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, y un 5% se usa como ingrediente en una amplia gama de productos alimenticios (IBGSC *et al.*, 2012).

Los cultivos de cebada son ampliamente adaptados a diversas condiciones ambientales y es más tolerante al estrés que sus parientes más cercanos, por lo que es una fuente importante de alimento en los países más pobres (IBGSC *et al.*, 2012). En países del primer mundo, se ha clasificado recientemente como un verdadero alimento funcional. El grano de cebada tiene un contenido de fibra particularmente alto, lo que reduce significativamente el riesgo de enfermedades humanas graves, incluyendo diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares y cánceres colorrectales que afligen a cientos de millones de personas en todo el mundo (IBGSC *et al.*, 2012).

Los cultivos de trigo (*Triticum aestivum L.*), cebada (*Hordeum vulgare L.*) y quinua (*Chenopodium quinoa Willd*), son sembrados en las zonas altoandinas del Perú, y son de gran importancia en términos de seguridad alimentaria para las familias campesinas ya que son utilizadas principalmente para cubrir sus

necesidades alimenticias (Pastor S, 2004). Además, constituyen una pequeña fuente de ingresos al comercializar los excedentes (Pastor S, 2004). Los cereales (como el trigo y la cebada) y granos andinos, (como la quinua, cañihua y kiwicha) en el Perú son de gran importancia económica, social y cultural; durante el 2010 se cosecharon alrededor de 351,130 hectáreas, alcanzando una producción de 483,400 toneladas y generando en campo más de 17 millones de soles en jornales (MINAGRI, 2011).

La producción de cebada, ha estado en aumento duplicándose en los últimos 20 años; de 68816 t en el año 1992 a casi 201 237 t en el año 2012, debido principalmente al incremento en 82% del área cosechada (81766 ha en 1992 y 148078 ha en el año 2012). El rendimiento promedio nacional de la cebada se ha incrementado en 75%, de 8416.21 Hg/Ha a 13589.93 Hg/Ha en este período (FAO, 2013). La mayor parte de las importaciones de cebada, en el Perú, se destinan a la industria cervecera y ha crecido en los últimos años. Las compañías cerveceras prefieren la cebada importada, ya que la producida en el país no alcanza los estándares mínimos de calidad para la elaboración de cerveza (INIA, 2013).

Las condiciones ambientales y climáticas en la zona de los andes del Perú son altamente favorables para el desarrollo de enfermedades en el cultivo de cebada (INIA, 2013). Entre uno de los mayores problemas para la producción de cebada, se encuentran la susceptibilidad de las variedades a enfermedades fúngicas, como la roya amarilla de cebada (*Puccinia striiformis*) causante de pérdidas en los cultivos. En este contexto, los trabajos de investigación en cebada

han sido dirigidos hacia la selección y desarrollo de nuevas variedades con mayores rendimientos, mayor adaptabilidad y con resistencia a enfermedades.

La roya amarilla (roya rayada), es una enfermedad de las plantas que comúnmente afecta cereales y pastos, causada por *Puccinia striiformis*, que pertenece a un grupo de hongos biótrofos obligados infectando el trigo, la cebada, el centeno, y más de 18 géneros de hierbas. Estos hongos se propagan por esporas en el aire a través de largas distancias (Liu M y Hambleton S, 2010). Históricamente, las epidemias por roya amarilla se produjeron principalmente en las zonas de clima templado, con veranos húmedos y frescos, o en zonas cálidas de gran altitud con noches frescas (Rapilly F, 1979).

El control de Roya Amarilla de Cebada, se ha realizado mediante la aplicación de productos químicos (como los fungicidas), obteniendo resultados eficaces. Sin embargo, este método de control, nunca ha sido considerado práctico, debido principalmente a los efectos negativos tanto en el hombre como en el medioambiente. Además, el fungicida perdura poco tiempo en la planta, comparado con el largo periodo de susceptibilidad del cultivo a la infección (Fernández, 1979). En este contexto una alternativa económica y ambientalmente favorable para el control de Roya amarilla de Cebada es el mejoramiento genético mediante la generación de variedades resistentes. (Roelfs *et al.*, 1992).

Teniendo en cuenta el desarrollo de variedades mejoradas, es esencial conocer la epidemiología de las enfermedades que afectan el cultivo, la virulencia (razas existentes) y la agresividad del patógeno sobre el cultivo (Roelfs *et al.*, 1992). Existen intentos continuos no solo nacionales, sino internacionales, por desarrollar variedades resistentes y durables a enfermedades como roya amarilla.

Muchas variedades liberadas han demostrado mantener un nivel de resistencia a Royas por muchos años, sin embargo, a la larga dicha resistencia se pierde. Casos como la variedad Dorada, en Ecuador, que fue liberada en 1971 y años más tarde perdió su resistencia. Asimismo, en el 2000 fue liberada la variedad Shyri y un año más tarde terminó perdiendo también su resistencia. (Rodriguez D. 2007)

Estos rompimientos de la resistencia en variedades mejoradas se deben a la virulencia del patógeno, que está en constante evolución, dando lugar a nuevas razas que son cada vez más agresivas. Por esta razón es imprescindible realizar un seguimiento constante de la enfermedad, para buscar adecuadas fuentes de resistencia que sirvan para futuros trabajos de mejoramiento del cultivo de cebada. Ya que, se conoce que las fuentes de resistencia tienen relación directa con la virulencia del patógeno. (Roelfs *et al.*, 1992)

Es por tales motivos, que estudios que aporten datos sobre la diversidad genética en roya Amarilla de Cebada en el Perú, ayudarían a desarrollar futuras variedades resistentes que sean más duraderas. Con este proyecto se espera confirmar la existencia de clusters de *Puccinia striiformis* que se diferencian a nivel molecular, de manera que se brinde una primera aproximación de la variabilidad genética de este patógeno en el Perú.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Planteamiento del Problema

Puccinia striiformis es el agente causal de la roya lineal o roya amarilla de la cebada. Es uno de los más destructivos en los cereales de invierno. Este patógeno se extendió por las principales regiones de cultivos de cebada. Los primeros reportes de aparición de Roya Amarilla de Cebada en América fueron en 1975 en Colombia (Brown *et al.*, 2001). La enfermedad se diseminó rápidamente hacia el sur, llegando al Perú, entre 1978 y 1979 (Dubin H y Stubbs R, 1986).

Esta enfermedad es una de las más devastadoras. Se presenta con mayor incidencia en los climas frío-templado, razón por la cual se suele encontrar en la zona andina del Perú. Asimismo, se encuentra en Ecuador, Colombia, Bolivia, Chile, México y Estados Unidos. (Ayo MR, 2015; Roelfs AP *et al.*, 1992) En las áreas donde las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo del hongo, se reproducen casi exclusivamente en forma asexual por medio de urediosporas producidas sobre el mismo cultivo. (Chen W *et al.*, 2014)

El control de Roya Amarilla de Cebada, se ha realizado mediante la aplicación de productos químicos (como los fungicidas), obteniendo resultados eficaces. Sin embargo, este método de control, nunca ha sido considerado práctico, debido principalmente a los efectos negativos tanto en el hombre como en el medioambiente. Además, el fungicida perdura poco tiempo en la planta, comparado con el largo periodo de susceptibilidad del cultivo a la infección (Fernández, 1979). En este contexto una alternativa económica y ambientalmente

favorable para el control de Roya amarilla de Cebada es el mejoramiento genético mediante la generación de variedades resistentes. (Roelfs *et al.*, 1992).

Es así que denodados esfuerzos se han realizado en el campo del mejoramiento genético, en busca de generar variedades resistentes y durables a estos patógenos. Sin embargo, los estudios actuales se enfocan en cereales de mayor importancia como el Trigo, lo cual ha hecho que los estudios pertinentes en Cebada hayan quedado relegados

Esto es un fuerte problema en países del tercer mundo, que es donde el cultivo de cereales como la Cebada son mucho más importantes que el Trigo. Ya que, en países alto andinos como el Perú, Bolivia y Ecuador, la principal fuente de ingresos y fuente de alimentos para los pobladores más pobres de estas zonas, es la Cebada.

Otro factor que contribuye a esta brecha de conocimiento es que la cebada no recibe tanta atención local de investigación como de otros cultivos como el maíz, el arroz y la papa. Si bien las iniciativas internacionales de investigación han arrojado luz sobre la variabilidad genética de Roya Amarilla del Trigo utilizando AFLP (Villareal *et al.*, 2002), y los AFLP y RAPD (Becerra *et al.*, 2007) No existen estudios que se hayan realizado específicamente para Roya Amarilla de cebada. Y aun más que se necesitan muchos estudios que puedan aportar con la distribución espacial y la diversidad genética de estos hongos patógenos en el Perú

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Cebada (*Hordeum vulgare L.*):

Origen y distribución:

La cebada fue uno de los primeros cereales en ser domesticado y cultivado en los inicios de la agricultura (IBGSC *et al.*, 2013; Ayo MR, 2015; Rodríguez D, 2007; Von Bothmed y Jacobson N, 1985). Originario de la antigua Mesopotamia y Persia, domesticado hace ya 10000 años, se expandió rápidamente hasta Asia, India, Etiopía y a finales del siglo XIV fue introducida en América (Ayo MR, 2015, AGOGTR, 2008).

La cebada cultivada deriva de su progenitor silvestre *Hordeum vulgare ssp. spontaneum* mucho antes de haber sido domesticada (IBGSC *et al.*, 2013; Ayo MR, 2015). Debido a su alta adaptabilidad a diferentes condiciones, el cultivo de cebada actualmente posee una amplia distribución geográfica a nivel mundial. Existen datos que demuestran que es cultivada en regiones agroecológicas tan disímiles como el centro de Europa, norte y sur de América y en regiones de Asia, África y Australia (Ayo MR, 2015; FAO, 2013; Robredo A, 2011).

Descripción botánica:

La cebada es una planta herbácea anual que puede llegar a medir entre 60 a 120cm de altura. Posee 2 tipos de sistemas de raíces, seminal y adventicia. La profundidad que alcanzan sus raíces depende de la textura, estructura del suelo y la temperatura del ambiente. Las raíces más profundas por lo general son de origen seminal, sin embargo, en las capas superiores presentan raíces adventicias. Si el grano es sembrado profundamente se formará un tallo “rizomatoso”, el cual luego dará inicio a las hojas una vez alcancen la superficie. El rizoma puede ser de

1 o varios entrenodos de longitud, el cual luego puede generar raíces adventicias (AGOGTR, 2008; González A, 2001).

Los tallos son erectos y compuestos entrenodos cilíndricos, y está separado por los nodos, los cuales soportan las hojas. Una planta de cebada adulta consiste de un tallo central y entre 2 - 5 ramas, llamadas macollos. El ápice del tallo principal y cada uno de los macollos fértiles dan lugar a una espiga. Cerca de la superficie del suelo, la parte de la base del tallo que lleva las hojas, forma una especie de corona. A partir de esta corona se desarrollan los macollos y las raíces adventicias (AGOGTR, 2008; González A, 2001).

Las hojas de cebada son lineales de 5 - 15 mm de ancho, y crecen en los lados alternos del tallo. La estructura de la hoja se compone de la vaina, lámina, aurícula y ligula. La vaina rodea completamente el vástago. La lígula y la aurícula sirven para distinguir cebada de otros cereales (AGOGTR, 2008; González A, 2001; Rodríguez D, 2007).

La inflorescencia en cebada es referida como la espiga. Las unidades de floración y las espiguillas, están unidos directamente al eje central, o raquis, que es la extensión del tallo que soporta la espiga. Hay tres espiguillas en cada nodo, llamados tripletes, intercalados en lados opuestos de la espiga. Cada espiguilla se compone de dos glumas, que son brácteas vacías, y un flósculo que incluye el lema, la pálea y los componentes reproductivos encapsulados. Dependiendo de la variedad, cada lema se extiende como una arista, o raramente como una capucha. Las glumas estériles en algunas variedades también pueden ser aristas. También se conocen variedades sin aristas (AGOGTR, 2008).

Taxonomía:

La cebada presenta la siguiente clasificación taxonómica:

REINO:	Plantae
PHYLUM:	Streptophyta
DIVISIÓN:	Tracheophyta
CLASE:	Liliopsida
ORDEN:	Poales
FAMILIA:	Poaceae
TRIBU:	Triticeae
GÉNERO:	Hordeum
ESPECIE:	vulgare

2.2.2. Roya amarilla de cebada (*Puccinia striiformis*)

Origen y distribución:

La roya amarilla o roya lineal, es una enfermedad que produce muchas pérdidas en los cultivos de cebada. Cuyo agente causal es un hongo *Puccinia striiformis*, que es uno de los más destructivos en los cereales de invierno. Este patógeno se extendió por las principales regiones de cultivos de cebada. Los primeros reportes de aparición de Roya Amarilla de Cebada en América fueron en 1975 en Colombia (Brown *et al.*, 2001). La enfermedad se diseminó rápidamente hacia el sur; en 1976 llegó a Perú y Ecuador, entre 1978 y 1979 se encontró en Bolivia, a fines de 1980 en Chile (Dubin H y Stubbs R, 1986), finalmente en 1990 se extendió hasta México y al año siguiente ya se encontraba en Estados Unidos (Marshall y Sutton, 1995)

Esta enfermedad que es una de las más devastadoras. Se presenta con mayor incidencia en los climas frío-templado. Razón por la cual se suele encontrar en la zona andina del Perú. Asimismo, se encuentra en Ecuador, Colombia, Bolivia, Chile, México y Estados Unidos. (Ayo MR, 2015; Roelfs AP *et al.*, 1992)

Taxonomía:

La Roya Amarilla de Cebada, presenta la siguiente clasificación taxonómica:

REINO:	Fungi
PHYLUM:	Basidiomycota
CLASE:	Urediniomycetes
ORDEN:	Uredinales
FAMILIA:	Pucciniaceae
GÉNERO:	Puccinia
ESPECIE:	striiformis

Morfología y Biología:

El hongo que causa la roya amarilla en diferentes cereales, es un parásito biotrofo obligado. El cual posee un ciclo de vida heteroico, es decir que precisa disponer de 2 hospederos diferentes para completar su ciclo de vida, se describe más adelante con detalles (Chen W *et al.*, 2014). Esta enfermedad se transmite por las esporas (urediniosporas) que se encuentran al interior de las pústulas que son transportadas por el viento pudiendo movilizarse cientos de kilómetros (Ayo MR, 2015) Para la germinación de las esporas es necesaria la presencia de rocío sobre

las hojas y una alta humedad, condiciones altamente determinantes (Roelfs *et al.*, 1992).

Las urediniosporas se desarrollan en series lineales y alargadas, llegando a medir más de 8 cm, sobre la superficie de la hoja, generando de esta manera áreas comúnmente amarillentas; con esporas de 25 – 30 x 14 – 26 micras, con paredes incoloras finamente equinuladas, de color amarillo, presentan de 8 a 10 poros germinativos dispersos. Los Telios están distribuidas en la superficie de las hojas, tallos e incluso en las espigas, siendo de color café oscuro, formando líneas largas y delgadas, que permanecen por mucho tiempo cubriendo la epidermis (Chen W *et al.*, 2014).

En las áreas donde las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo del hongo, se reproducen casi exclusivamente en forma asexual por medio de urediosporas producidas sobre el mismo cultivo. Una vez que las hojas se comienzan a secar el hongo forma telios de color negro que contiene teleosporas. (Chen W *et al.*, 2014)

Ciclo de Vida de Puccinia striiformis:

Puccinia striiformis (Ps), en la etapa asexual de urediniosporas, infecta una gama de hierbas dentro de la familia Poaceae. Colecciones de Ps de ciertas hierbas mostraron evidencia de especialización por hospedero, que sirvió para proponer cinco formas especiales (en latín, formas especiales) a partir de los géneros originarios del huésped. (Eriksson J, 1894)

Teniendo de esta manera: *P. striiformis f. sp. tritici* (Pst) especializada en el trigo, *P. striiformis f. sp. hordei* (Psh) en cebada, *P. striiformis f. sp. secalis* en

centeno, *P. striiformis f. sp. elymi* en *Elymus spp.*, *P. striiformis f. sp. agropyri* en *Agropyron spp.* Asimismo, se tiene informes de formas especiales adicionales: *P. striiformis f. sp. dactylidis* (Psd) en pasto ovilla (*Dactylis glomerata L.*), *P. striiformis f. sp. poae* (Psp) en el pasto azul de Kentucky (*Poa pratensis L.*), *P. striiformis f. sp. leymi* en *Leymus secalinus* y *P. striiformis f. sp. pseudo-hordei* (Psp-h) en *Hordeum spp.* en Australia. (Chen W *et al.*, 2014)

Desde que se identificó a *Berberis spp.* como hospedero alternativo de la Roya Amarilla del Trigo, se evidenció que este patógeno tiene un ciclo de vida heteroico (Figura 4) (Jin *et al.*, 2010). Asimismo, se demostró que la uva de Oregon (*Mahonia aquifolium*) es también un hospedero para la fase sexual de la Roya Amarilla del Trigo (Wang MN y Chen XM., 2013). Las urediniosporas son principalmente dicarióticas (n+n) y mantienen su estado asexual dentro de su hospedero primario. Esta fase es la responsable a gran escala de las epidemias de roya lineal reportadas en cultivos de cereales. (Chen W *et al.*, 2014)

Sin embargo, estas últimas investigaciones fueron desarrolladas y descubiertas para Roya amarilla del trigo y hasta la fecha aún no se conoce el hospedero alterno en caso de Roya Amarilla de cebada. Pero es muy probable que se trate de una planta del género *Berberis spp* o una estrechamente cercana a dicho género.

A medida que la temperatura aumenta al final de la fase de infección, *Puccinia striiformis* produce típicamente teliosporas de 2 células. Cada célula de una teliospora madura contiene un núcleo diploide (2n) formado por cariogamia, es decir, por fusión de dos células haploides. Esta capacidad de formar teliosporas varía según las condiciones ambientales. A continuación, la meiosis produce

entonces un solo núcleo haploide que forma una basidiospora (48h). Estas basidiosporas germinan y son las que infectan al hospedero alternativo (*Berberis spp.*). Son necesarios aproximadamente unas 40h para la infección de las hojas del hospedero. Finalmente, estos reservorios de basidiosporas son dispersados a través del viento en su hospedero final (cereales como trigo o cebada) (Figura 01) (Chen W. *et al.*, 2014; Hovmøller MS. *et al.*, 2011)

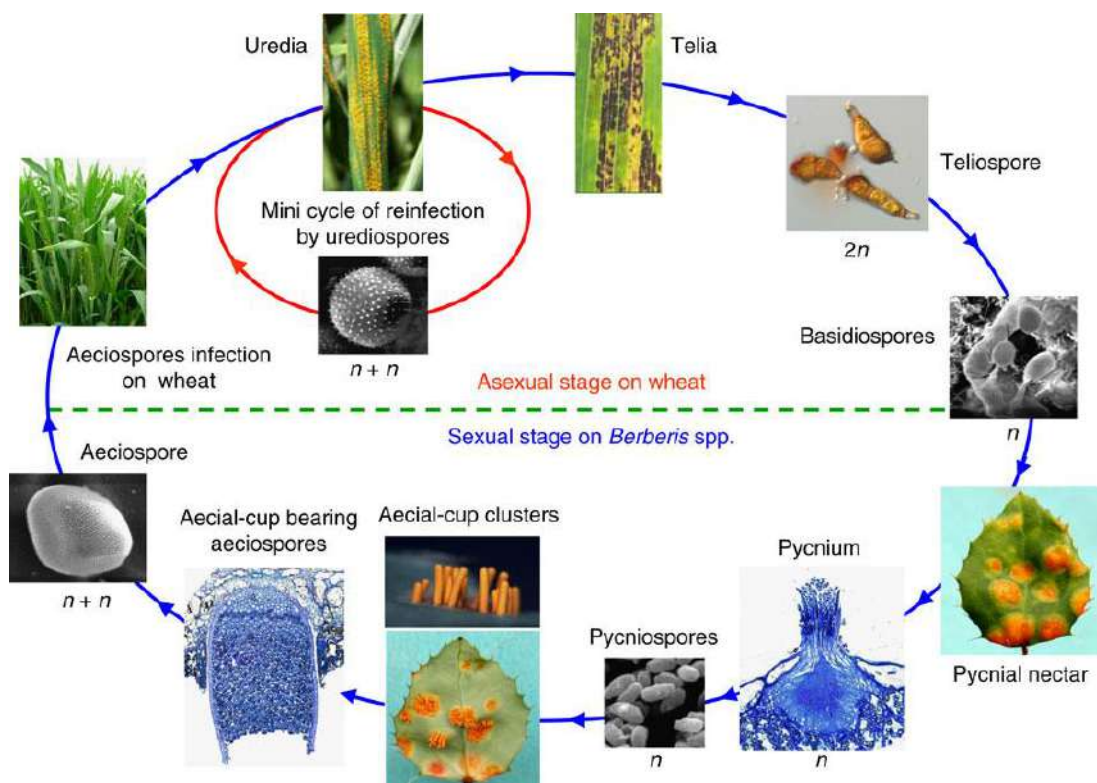


Figura 01: Ciclo de vida de *Puccinia striiformis* (Chen W *et al.*, 2014). Uredios infectando hojas de cereales y formando urediosporas ($n+n$). Telios típicamente formados en la epidermis de las hojas necrosada, luego de la temporada de infección y producen Teliosporas ($2n$). Basidios, son las teliosporas desarrolladas y producen basidiosporas (n). Pícnios, son las basidiosporas que infecta al hospedero alternativo (*Berberis spp.*) formando el néctar picneal, estructura que

luego produce picniosporas (n). **Ecios**, Se agrupan formando copas eciales las cuales producen aeciosporas (n+n)

Sintomatología de la enfermedad:

La Roya Amarilla, es un hongo que ataca a cualquier parte de la planta de cebada, pero principalmente se encuentran en las hojas. En las hojas, el hongo produce pústulas de color amarillo y aspecto pulverulento, dispuestas en forma de estrías lineales y paralelas al sentido de las nervaduras. Los síntomas se pueden presentarse en cualquier hoja de la planta, pero preferentemente en las hojas del tercio medio de la planta, con pústulas visibles y formando líneas de 2-4 cm o más. El desarrollo de la infección puede ser muy agresivo, dañando completamente las hojas entre 12-15 días, incluso hasta las vainas foliares. (Ayo MR, 2015)

2.2.3. Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética

Un marcador genético es una porción de ácido nucleico (ADN) o el producto de una porción de ácido nucleico (proteína) del organismo en estudio. Para realizar inferencias biológicas, se estudia la variación de la misma porción de ADN en individuos diferentes. Es importante que dicha porción de ADN se encuentre en el mismo lugar en el genoma de cada individuo (es decir, en el mismo lugar en el mismo cromosoma), lo cual se indica usando el término locus. Para que un locus sea informativo debe ser variable (es decir, polimórfico). Esto significa que la secuencia de ADN debe ser diferente entre los individuos y dicha diferencia en las secuencias son denominados alelos.

Existen diferentes tipos de marcadores (Barker, 2002; Singh, 1997). Entre los más usados se encuentran los genes mitocondriales, las regiones espaciadoras internas de transcripción de ácidos ribonucleicos ribosomales (rRNA), repeticiones en tándem, los cuales incluyen a los minisatélites y microsátélites, y las mutaciones puntuales de secuencia (SNP).

Genes mitocondriales

La diversidad genética se basa en las diferencias encontradas en los genes mitocondriales específicos siendo la más empleada el citocromo oxidasa (COX) (Vogler RE, 2013). Los genes mitocondriales evolucionan más rápido que los genes nucleares, esta característica los hace más variables y adecuados para diferenciar los organismos cercanamente relacionados (Singh, 1997). Además, el ADN mitocondrial es circular y más resistente a la degradación.

Regiones espaciadoras internas de transcripción (ITS)

Son regiones variables distribuidas al azar en el genoma que usualmente son analizadas con la técnica de RFLP, pero también con RAPDs. El ITS está compuesto de regiones ITS1 e ITS2, separados por el gen 5.8S que contiene secuencias repetidas en tándem. Dicha característica permite utilizarlas para la diferenciación entre diferentes individuos.

Microsátélites:

Los microsátélites son repeticiones en tándem de 1-6 nucleótidos encontrados con alta frecuencia en los genomas nucleares de muchos taxa. Se

conocen también como repeticiones de secuencia simple (SSR), repeticiones en tándem en número variable (VNTR) o repeticiones pequeñas en tándem (STR). (Li YC *et al.*, 2002).

2.2.4. Estimación de la diversidad genética

Distancias Genéticas:

Cuando dos individuos derivan de un ancestro en común, las secuencias descendientes gradualmente divergen por sustituciones de nucleótidos (Nei M y Kumar S, 2000). Una medida simple de la cantidad de divergencia está dada por la proporción (p) de sitios nucleotídicos en las cuales ambas secuencias son diferentes. Esta proporción puede ser calculada a partir de la ecuación:

$$p = nd/n$$

Donde nd y n son, el número de nucleótidos diferentes entre las dos secuencias y el número total de nucleótidos examinados, respectivamente. Esta medida de la divergencia entre secuencias es llamada distancia p.

Dado que los cambios mutacionales del ADN no necesariamente ocurren de manera azarosa (*e.g.* en secuencias codificantes los patrones de sustitución en la primera, segunda o tercera posición del codón no son los mismos; Nei M y Kumar S, 2000), otra manera de calcular la divergencia entre secuencias es a partir del uso de modelos matemáticos de sustitución de nucleótidos.

Estos modelos asumen diferentes posibilidades para las sustituciones de nucleótidos, incluyendo por ejemplo tasas transicionales (cambio entre bases púricas *i.e.* A↔G, o pirimidínicas *i.e.* T↔C) y transversionales (*i.e.* purina↔pirimidina). Entre estos modelos se encuentran el de Jukes-Cantor (JC),

el de Jin-Nei (JN), el de Tajima-Nei (TN84), el de Kimura dos Parámetros (K2P) (Nei & Kumar, 2000). A partir del uso de modelos de sustitución nucleotídica, es posible calcular distancias genéticas corregidas.

2.2.5. Parámetros Genético Poblacionales

Variabilidad genética (Polimorfismos de ADN):

Secuencias de ADN variables en un locus dentro de una especie, representan los diferentes alelos que pueden estar presentes en toda la población. Puesto que las secuencias de ADN están compuestas por muchos sitios variables de nucleótidos, definir un alelo es algo más complejo que si los alelos fueran discretos (*i.e.* A or a). Es por ellos que es importante tener parámetros que puedan estimar la variabilidad genética (Polimorfismos de ADN) de una población. Para ello existen índices de medición de la variabilidad genética tales como: la diversidad haplotípica (H_D), la diversidad nucleotídica (π) y el estimador de Watterson (θ).

La diversidad haplotípica (H_D) considera la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar en una población sean diferentes (Nei M, 1987). La diversidad nucleotídica (π , π) computa el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias elegidas al azar (Nei M y Li WH, 1979). El estimador de Watterson (teta, θ) da cuenta del número de sitios segregantes (= polimórficos) en una muestra de secuencias por sitio (Watterson GA, 1975).

Análisis Demográfico:

Durante décadas la genética de poblaciones se ha ocupado del problema de cuantificar la contribución relativa de la selección natural en el modelado de la variación genética observada entre los organismos vivos (Nielsen R, 2005). Para la Teoría Neutral de Evolución Molecular la mayor parte de la variación molecular dentro y entre las especies es selectivamente neutral, es decir, no afecta la aptitud de los organismos (Kimura M, 1968, 1983; Nei M *et al.*, 2010). Así, el destino evolutivo de esta variación en la población puede ser explicado adecuadamente a través de factores estocásticos, aun cuando no proporcionan ninguna ventaja a la aptitud de sus portadores. En este contexto, el proceso por el cual cambian las frecuencias alélicas en las poblaciones debido a factores aleatorios es referido como deriva genética. Una segunda Teoría, la Seleccionista, sostiene que una gran proporción de la variación observada si afecta la aptitud de los organismos y está sujeta a selección Darwiniana (Gillespie JH, 1991).

Suponiendo un modelo poblacional clásico con dos alelos A y a, se habla de selección si la aptitud (W) de los tres posibles genotipos (W_{AA} , W_{Aa} , W_{aa}) no es igual. Ejemplo de ello serían: $W_{AA} > W_{Aa} > W_{aa}$; $W_{AA} < W_{Aa} < W_{aa}$ o $W_{AA} < W_{Aa} > W_{aa}$. En organismos haploides, se habla de selección si $W_A \neq W_a$. Contrariamente, si una nueva mutación no afecta la aptitud del individuo en el que surge ($W_{AA} = W_{Aa} = W_{aa}$; en el caso de haploides $W_A = W_a$), se dice que es neutra.

En términos generales, la neutralidad describe la condición donde los loci en consideración no se ven afectados por la selección (Nielsen R, 2005). Un método estadístico destinado a rechazar un modelo de evolución neutral es denominado prueba de neutralidad (Nielsen R, 2005).

Hasta el presente, un número creciente de pruebas de neutralidad han sido desarrolladas y se ha demostrado que los desvíos de la hipótesis nula no sólo pueden ser consecuencia de selección sino también de eventos demográficos, dado que los cambios de tamaño poblacional pueden dejar huellas particulares que podrían, eventualmente, ser detectadas (Ramírez-Soriano *et al.*, 2008).

Existen varios estimadores frecuentemente utilizados en el análisis de la estructura poblacional y filogeografía, para detectar huellas de posibles eventos demográficos, entre ellos las pruebas de neutralidad de Tajima (D_T) (Tajima F, 1989) y F_s (Fu YX, 1997).

- **Prueba de Tajima:**

Se basa en la detección de las diferencias entre los estimadores π y θ con la determinación de la D de Tajima, calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$D_T = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{\text{Var}(\pi - \theta)}}$$

Si D_T es igual a cero, no existe diferencia alguna entre ambos estimadores indicando evolución neutral (Tajima F, 1989). Los valores negativos de D_T sugieren un exceso de variantes de baja frecuencia o alelos raros y son comúnmente interpretados como evidencia de barrido selectivo reciente, selección purificadora, migración, expansión poblacional, o cuello de botella severo en el pasado remoto (Schmidt D y Pool J, 2002; Pool J y Aquadro CF, 2006). Contrariamente, valores positivos indican un exceso de variantes intermedias y son interpretados

como evidencia de alguna forma de selección equilibradora, reducción poblacional, subdivisión poblacional, cuello de botella reciente o migración (Schmidt D y Pool J, 2002).

- **Prueba de F_S de Fu: (Fu, 1997)**

Este estadístico se basa en la probabilidad de observar una muestra al azar con un número de alelos igual o menor que el valor observado de π , bajo la suposición de que todos los alelos son selectivamente neutrales. Es decir, se evalúa la probabilidad de observar no menos de k haplotipos en una muestra de n secuencias dado un cierto valor de θ , estimado a través de π . Si se denomina a esta probabilidad \hat{S} , entonces:

$$F_S = (\hat{S} / 1 - \hat{S})$$

Un valor negativo de F_S indica un número de alelos raros excesivo, y es interpretado como evidencia de expansión poblacional (Pilkington MM *et al.*, 2008) o selección, mientras que valores positivos sugieren poblaciones estables (Bell KC *et al.*, 2010). Simulaciones realizadas por Fu, sugieren que el estimador F_S es más sensible a la expansión poblacional y hitchhiking que la prueba de Tajima. Asimismo, y a partir de simulaciones se demostró que F_S debe ser considerado como significativo si $p < 0,02$.

2.2.6. Estructura y Diversidad Genética

En la actualidad existen numerosos métodos estadísticos disponibles para medir el grado de diferenciación espacial, los patrones espaciales de variación

genética, y el significado de la variación entre las poblaciones. La medición de los patrones espaciales tiene una amplia gama de aplicaciones para probar hipótesis tales como si la variación genética se encuentra idénticamente distribuida entre las poblaciones o si por el contrario existe aislamiento genético a consecuencia de la distancia geográfica, entre otros muchos procesos (Epperson BK, 2003). A continuación, se detalla el análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizado en el presente trabajo para entender cómo está distribuida la variación genética en las muestras.

Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA):

El análisis de la varianza molecular o AMOVA (del inglés Analysis of Molecular Variance) es un procedimiento estadístico que permite un particionamiento jerárquico de la variación genética entre poblaciones y regiones (Peakall R y Smouse PE, 2009) así como la estimación de los estadísticos F (y/o sus análogos los estadísticos Φ) ampliamente utilizados en genética de poblaciones (Excoffier L *et al.*, 1992). Los estadísticos F (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) fueron presentados primeramente por Wright (Wright S, 1951) como una manera de describir la estructura genética poblacional en organismos diploides (Avice JC, 2004).

En la actualidad estos estadísticos son ampliamente utilizados para caracterizar la estructura genética de las poblaciones y existen numerosas aproximaciones matemáticas (*e.g.* Nei M, 1973, 1977; Weir BS. Cockerham CC, 1984) para su cálculo a partir de diversos datos empíricos. En términos generales,

en un AMOVA la variación genética se descompone en los siguientes niveles jerárquicos:

Φ_{CT} : diferenciación genética entre regiones (grupos) en relación con la población total.

Φ_{SC} : diferenciación genética entre poblaciones dentro de las regiones (grupos).

Φ_{ST} : diferenciación entre los individuos dentro de las poblaciones.

Vale aclarar que los valores de los estadísticos Φ en el AMOVA son variables aleatorias y pueden tomar tanto valores positivos como negativos, caso este último en el que deben ser interpretados como 0 (Tzeng TD *et al.*, 2004). En cualquiera de los niveles, es importante tener en cuenta cuales son las hipótesis evaluadas, siendo H_0 = ausencia de diferencias genéticas (*e.g.* $\Phi_{ST} = 0$) y H_1 = diferenciación genética (*e.g.* $\Phi_{ST} > 0$). Así, para un AMOVA si se definiera en principio varias subpoblaciones (*e.g.* por localidades geográficas) sin considerar regionalización, la hipótesis nula será que las subpoblaciones pueden ser consideradas como parte de una gran población genética. De ser verdadera la H_0 , cualquier grupo subpoblacional definido será arbitrario y representará meramente una muestra del pool génico, por lo que se encontrarán pocas diferencias genéticas entre las subpoblaciones arbitrarias (Peakall R y Smouse PE, 2009).

Al aleatorizar las muestras para el conjunto de datos y calcular el AMOVA para cada aleatorización, se obtienen valores cercanos a los esperados por azar. Al realizar múltiples aleatorizaciones se puede obtener una buena estimación del valor esperado si la H_0 fuera cierta y es la razón por la que la significancia estadística del AMOVA es evaluada mediante permutaciones al azar (Peakall R y Smouse PE, 2009).

2.3. Justificación del Estudio:

Desde tiempos antiguos la cebada ha sido cultivada ampliamente en el mundo, debido a que es uno de los cereales con alto valor nutricional después del arroz, el maíz y el trigo. La cebada al igual que el trigo es un alimento esencial en la industria de la panadería, sin embargo, su principal uso es en la industria cervecera.

La cebada es un cultivo de secano que está adaptado a zonas altas de la sierra, debido a su ciclo vegetativo corto y está adaptado a suelos con bajos niveles de fertilidad. Las condiciones agroecológicas para el cultivo de cebada son aquellas comprendidas entre 2 400 a 3 300 msnm, un clima que incluya una precipitación de 400 a 600 mm a lo largo del ciclo de cultivo, un suelo franco arenoso, profundo con buen drenaje y con un pH que oscile entre 6.5 a 7.5 (Ayo MR, 2015).

En las últimas décadas la producción de cereales a nivel mundial llegó a un volumen promedio anual cercana a los 2750 millones de toneladas (Figura 02) (FAO, 2013). Hoy en día representa el cuarto cereal más abundante en la superficie terrestre, con aproximadamente tres cuartas partes de producción mundial utilizados para la alimentación animal, 20% es malteada para su uso en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, y un 5% como ingrediente en una amplia gama de productos alimenticios (IBGSC *et al.*, 2013).

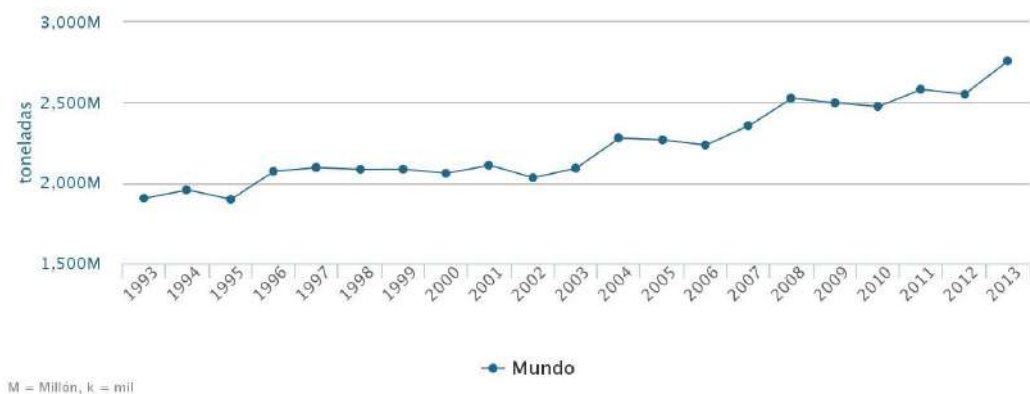


Figura 02: Producción de Cereales totales a nivel mundial (1983-2013)

En el Perú la producción de cebada, ha estado en aumento, duplicándose la producción en los últimos 20 años; de 113000 toneladas en el año 1993 a casi 225000 toneladas en el año 2013 (Figura 03) (FAO, 2013). Mientras que el rendimiento promedio nacional de la cebada se ha incrementado en 30%, de 11000 Hg/Ha a 14500 Hg/Ha en este período. El motivo de su importancia como cultivo radica tanto en la diversidad de usos que posee como en su amplia adaptación ecológica (Figura 04) (FAO, 2013; Canal G, 2012)

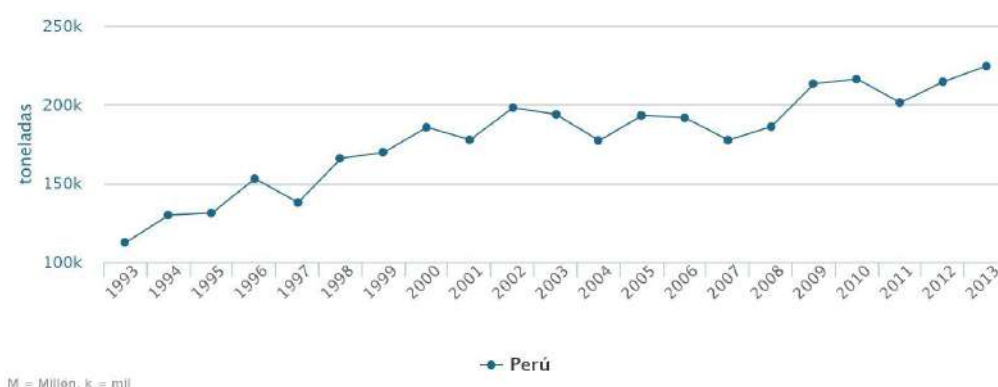


Figura 03: Producción de cebada en el Perú (1993-2013)

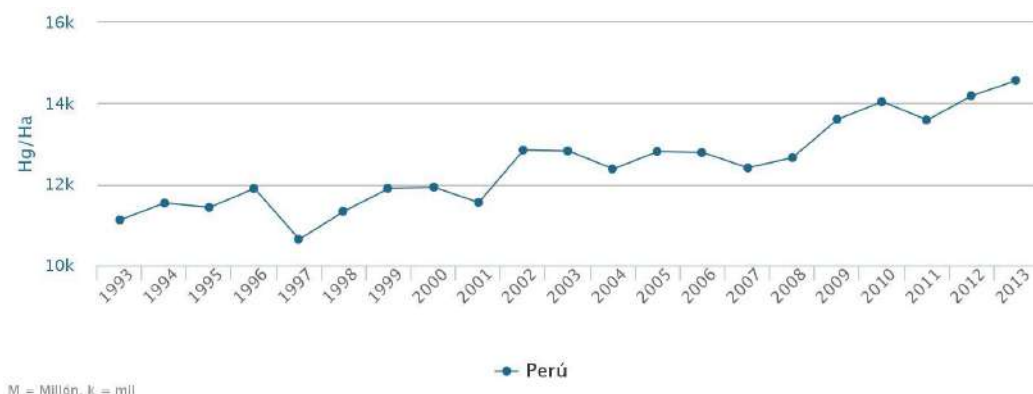


Figura 04: Rendimiento de Cebada en el Perú (1993 - 2013)

Actualmente, la producción nacional se debe en su mayoría a cultivos de pequeños agricultores que utilizan el grano y sus derivados como alimento diario para su subsistencia (FAO, 2013). Sin embargo, desde el punto de vista de seguridad alimentaria la cebada es un rubro esencial para todo el país.

Existen tres principales hongos que ocasionan los mayores daños económicos en los cultivos de cebada (Tabla 01). Estas enfermedades son provocadas por Royas, las cuales pertenecen al género *Puccinia spp.* Entre ellas, la roya amarilla y de la hoja son dos enfermedades de gran importancia económica a nivel mundial, además de ser el principal motivo del retiro de variedades resistentes, a medida que aumenta el nivel de susceptibilidad de las mismas. En los últimos años a nivel mundial se ha avanzado en la introducción de resistencia en este cultivo, a través del mejoramiento de los genotipos. No obstante, cabe señalar que debido a la alta virulencia de las royas este patógeno sigue causando inquietud, por ende, su estudio e importancia aumentan. (Ayo MR. 2015).

Tabla 01: Enfermedades en Cebada por Royas

Enfermedad	Hongo Patógeno	Hospedero
Roya Amarilla o Roya Estriada	<i>Puccinia striiformis</i>	Cebada
Roya Parda o Roya de la Hoja	<i>Puccinia hordei</i>	Cebada
Roya Negra o Roya del Tallo	<i>Puccinia graminis</i>	Cebada

Una alternativa para lograr mayor durabilidad de la resistencia a roya amarilla es mediante la formación de genotipos que posean resistencia durable, basada en genes menores que confieren resistencia para el desarrollo lento de la enfermedad (slow rusting); el efecto de un gen de resistencia para el desarrollo lento en el progreso de la enfermedad fluctúa de pequeño a moderado, pero la combinación de dos o más genes de efectos aditivos resulta en un alto nivel de resistencia (Villaseñor O *et al.*, 2009).

Los conocimientos adquiridos por este proyecto contribuirán a la solución de los problemas fitosanitarios por Roya Amarilla de Cebada (*Puccinia striiformis*). Ya que al conocer la estructura poblacional y la diversidad de este patógeno en el Perú favorecerá al inicio de un programa de mejoramiento en cebada adecuado, trayendo en una resistencia durable con inoculos de poblaciones diferenciales de Roya Amarilla del Perú.

2.4. **Objetivos:**

Objetivo general:

Con este proyecto se espera confirmar la existencia de clusters de *Puccinia striiformis* que se diferencian a nivel molecular.

Objetivos específicos:

- Evaluar la diversidad genética del patógeno (Roya Amarilla) en el Ayacucho.
- Identificar clusters de *Puccinia striiformis* mediante métodos de agrupamiento basados en análisis de secuencia.
- Mapear geográficamente la distribución de los clusters identificados.

III. METODOLOGIA

3.1. Material Biológico:

3.1.1. Colecta de Muestras:

Se realizó viajes a Ayacucho con la finalidad de hacer colectas de las muestras, con la colaboración de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH). La colecta se realizó abarcando 5 diferentes provincias de la región norte de Ayacucho, que son las zonas donde hay mayor incidencia de Roya Amarilla.

Las muestras fueron colectadas en viales en completa esterilidad, para evitar contaminación entre muestras. Se tomaron las hojas de cebada con la mayor cantidad de lesiones (pústulas), producida por infecciones de Roya Amarilla (Figura 05).



Figura 05: Síntomas de infección por roya amarilla

3.1.2. Clasificación de las Muestras:

Todas las muestras colectadas se llevaron a Lima para ser almacenados a -80°C en el laboratorio hasta su procesamiento. Adicionalmente se utilizaron también muestras colectadas años anteriores por el Laboratorio de la Unidad de Genómica (2010 al 2012), conservados a -80°C. Finalmente se clasificaron y rotularon las muestras por fecha de colecta y por su lugar de procedencia; adicionalmente se les asignó un código para poder contabilizarlas dentro del laboratorio. Las muestras fueron colectadas de un total de 30 diferentes comunidades pertenecientes a 11 distritos y 5 provincias (Tabla 02)

Tabla 02. Representación de las muestras colectadas en provincias

N° de Muestras	Distrito	Provincia
1	Los Morochucos	Cangallo
1	Carmen alto	Huamanga
13	Chiara	Huamanga
15	Quinoa	Huamanga
12	Socos	Huamanga
8	Vinchos	Huamanga
1	Acocro	Huamanga
4	Ayahuanco	Huanta
15	Huamanguilla	Huanta
10	San Miguel	La Mar
4	Vischongos	Vilcashuaman

3.2. Procedimiento Experimental

3.2.1. Aislamiento de esporas:

Teniendo ordenadas y clasificadas las muestras de hojas de cebada infectadas con Roya Amarilla, se procedió a separar las urediniosporas (Figura 06) del tejido vegetal. Se estandarizó un método diseñado en el laboratorio para separarlas por centrifugación sin dañar el tejido vegetal. En tal sentido se ideó el siguiente protocolo de aislamiento de esporas:

En primer lugar, se esterilizó con etanol una placa Petri, un portaobjeto y un bisturí. Después, con ayuda de un estereoscopio, se enfocaron las muestras de hojas colocadas en portaobjetos ubicando las pústulas hacia el enfoque y se verificó que haya una buena cantidad de pústulas abiertas (caso contrario se utilizó una aguja esterilizada para poder abrir las pústulas y dejar expuestas las esporas).

Luego se pasó la hoja a una placa Petri para cortarla en fragmentos pequeños, tratando de tomar la mayor cantidad de pústulas, y se traspasaron en tubos de 1.5mL, se agregó NFW con sumo cuidado hasta cubrir todas las hojas, para luego centrifugarlas a máxima velocidad (14000 rpm) por 10-20 minutos hasta que se obtuvo un pellet de esporas.

Se eliminó el sobrenadante y el tejido vegetal tratando de no dejar residuos, y sin perturbar el pellet de esporas, para finalmente realizar la extracción de ADN.

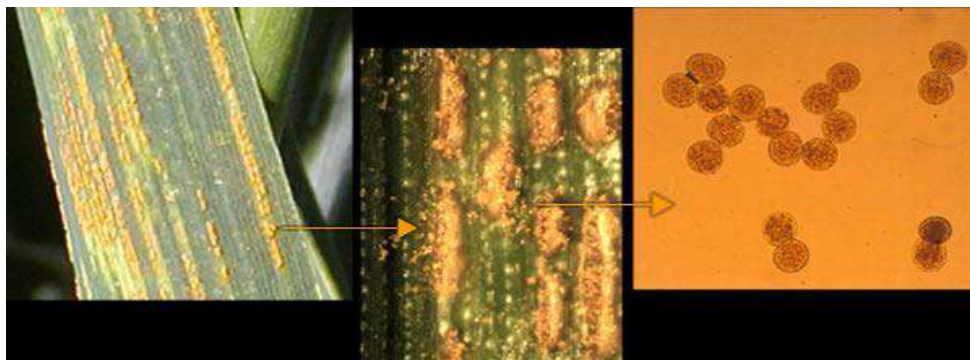


Figura 06: Hojas infectadas conteniendo urediniosporas del hongo

3.2.2. Extracción de ADN:

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de los 84 aislamientos de urediniosporas de *Puccinia striiformis*. Para dicho procesamiento de muestras se estandarizó el protocolo de CTAB/NaCl, con ligeras modificaciones para esporas.

Se colocaron los aislamientos de urediniosporas del patógeno en tubos de 1.5mL a los que previamente se añadió 100uL de buffer de extracción (CTAB 2%, Tris 0.2M pH 8, EDTA 0.02M pH8, NaCl 1.4M y β -mercaptoetanol 0.2%). A continuación, se introdujo un pilón de plástico para moler las esporas mecánicamente. Luego de triturar por completo las esporas se agregó 20 μ L de Proteinasa K (20 ng/ μ L) y 500uL de buffer de extracción, luego se colocó los tubos en baño María a 65°C por espacio de 2 horas en agitación. Después de transcurrida la incubación, se dejó enfriar a ambiente y se agregó 600uL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a máxima velocidad (14000 RPM) por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 2mL, se adicionó 50uL de CTAB 10X y se mezcló. Luego se repitió, la separación con cloroformo:alcohol isoamílico, y la centrifugación. Para la precipitación de ADN,

el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo de 1.5mL y se agregó 2 volúmenes de isopropanol frío y se puso a -20°C por una noche.

Posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Se procedió luego a lavar el pellet con 1mL de etanol 80% frío por 1 minuto y se centrifugó a máxima velocidad por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se realizó un nuevo lavado con etanol 90% frío, se centrifugó y se dejó secar el pellet por 1 hora a temperatura ambiente. Para resuspender el ADN se utilizó 100uL de buffer T₁₀E₁ (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM), y se incubaron las muestras a 37°C por 1 hora conteniendo 2uL de RNAsa 10mg/mL. Finalmente, estas muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

3.2.3. Cuantificación, visualización y dilución del ADN genómico:

Para determinar la pureza y las concentraciones de ADN extraído de las muestras, se utilizó un Biofotómetro D30 Eppendorf®, el cual es un espectrofotómetro de amplio rango de longitud de onda. Las muestras de ADN fueron atemperadas en caso de congelación y se colocaron alícuotas de 2uL en la cámara de medición (cubetas de 1mm). En el equipo se tuvieron varias consideraciones como:

- La concentración en ng/uL en base a la absorbancia a la longitud de onda adecuada (260nm).
- La relación de absorbancias 260/280, para determinar el nivel de pureza de las muestras y la contaminación de tipo proteica y/o por alcoholes.
- La relación de absorbancias 260/230, para determinar la contaminación por sales.

Una vez cuantificadas todas las muestras y determinados sus niveles de pureza, se procedió a realizar una corrida de electroforesis para visualizar y determinar si el ADN estaba degradado. Se preparó un gel de agarosa 1% en buffer TBE 1X (Tris-HCl 1M, Ácido Bórico 1M, EDTA 0.02M pH8) teñido con Bromuro de Etidio 0.5 ng/uL de acuerdo al protocolo propuesto por Sambroock *et al.* (1989) La corrida se llevó a cabo a 90 voltios por espacio de 1 hora en una cámara horizontal Cleaver Scientific Ltd®. La visualización se realizó bajo luz UV en un fotodocumentador que generó las fotografías para observar la calidad de ADN.

Una vez evaluada la calidad, pureza y concentración de los ADN genómicos se realizó la dilución de las mismas. Las muestras fueron diluidas con agua libre de nucleasas (NFW, Nuclease-Free Water) hasta obtener la concentración final óptima para su trabajo posterior.

3.2.4. PCR para amplificación del gen ITS:

Se utilizaron primers universales para poder amplificar la región espaciadora ITS1, la subunidad ribosomal 5.8S y la región espaciadora ITS2. Esta región es muy utilizada en estudios de diversidad genética y filogenia, ya que se trata de un gen ampliamente conservado entre especies.

Los primers universales ITS1, ITS1F, ITS2, ITS2R, ITS3, ITS4 e ITS5 fueron probados para amplificar ADN de los aislamientos mediante PCR (White *et al.*, 1990), hasta encontrar los más adecuados. Luego de las pruebas respectivas, se decidió elegir los primers ITS1F (Gardes M y Bruns TD, 1993) e ITS2R, ya que este par mostró una mejor calidad en las bandas discretas. (Tabla 03)

Tabla 03. Cebadores Específicos para ITS

Primer (Cebador)	Secuencia	N bases
ITS1F (forward)	5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3'	22bp
ITS2R (reverse)	5' TGTGTTCTTCATCGATG 3'	17bp

Estandarización de las condiciones de PCR

Antes de poder amplificar el gen en todos los individuos se estandarizaron las condiciones más adecuadas para la reacción de PCR. En tal sentido los parámetros principales que se evaluaron, fueron los siguientes:

- Concentración de ADN
- Temperatura de hibridación Th
- Concentración de MgCl₂ (Cloruro de magnesio)

Se preparó una gradiente de ADN donde las concentraciones finales, expresadas en peso neto de ADN, estuvieron entre 20ng y 200ng por reacción. (Ver Tabla 04)

Para determinar la temperatura de hibridación de los cebadores se hizo ensayos con varias muestras al azar (se probaron unas 10 en total). Se elaboró una gradiente de temperatura entre 50°C - 65°C. (Ver Tabla 04).

Al mismo tiempo que se determinaba la Temperatura de hibridación, se estandarizó también la concentración de MgCl₂. Entonces, se establecieron 4 repeticiones (grupos) con las mismas gradientes antes mencionadas. Cada grupo se probó con una concentración diferente de MgCl₂ siendo estas de 1.5mM, 2mM, 2.5mM y 3mM por reacción. (Ver Tabla 04)

Tabla 04. Reactivos del master mix para la PCR:

Reactivo	Concentración	
	Inicial	Final
NFW	--	--
Buffer de PCR	5X	1X
MgCl₂	25mM	1.5mM – 3mM
dNTPs	10mM	0.2mM
Primer Forward (ITS1F)	10uM	0.4uM
Primer Reverse (ITS2R)	10uM	0.4uM
Taq DNA Polimerasa	5U/uL	1U/reacción
ADN	20ng/uL	20ng – 200ng
Volumen Total Final	25uL por reacción	

Todos los ensayos de PCR fueron realizados en termocicladores Mastercycler® Pro de Eppendorf®. Se utilizaron los cebadores para ITS (Tabla 03) siguiendo las condiciones mostradas debajo (Tabla 05), cabe mencionar que estas condiciones se utilizaron a partir del protocolo descrito por Wang (Wang Y *et al.*, 2009) con ligeras modificaciones.

Tabla 05. Condiciones de las reacciones de PCR

	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Pre-Desnaturalización	1	95°C	5 minutos
Desnaturalización	34	94°C	30 segundos
Hibridación		50°C – 65°C	40 segundos
Elongación		72°C	1 minuto
Elongación Final	1	72°C	10 minutos
Conservación	1	15°C	Indefinido

Amplificación del gen ITS en todos los individuos:

Una vez que se lograron estandarizar las condiciones de la temperatura de hibridación, concentración de ADN y MgCl₂. Se procedió a realizar la amplificación de ITS por PCR, a partir de las 84 muestras de ADN diluidas. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en TBE 1X y se corrieron a 90V por 1 hora. Se usó como marcador de peso molecular GeneRuler 100bp DNA Ladder de ThermoFischer Scientific™. Finalmente fueron fotografiados mediante el fotodocumentador. (Figura 10)

3.2.5. Clonamiento y secuenciamiento del gen ITS:

A pesar de que se optimizaron las condiciones de PCR con los primers ITS1F e ITS2R, para obtener una banda discreta, las secuencias obtenidas en su mayoría resultaron en electroferogramas con demasiado ruido y/o con presencia de posiciones ambiguas múltiples (Vogler RE, 2013). La primera explicación que se estableció fue que el fragmento de ITS purificado luego de la PCR, tenía

insuficiente concentración y no alcanzaba al mínimo recomendado por el servicio de secuenciamiento de 20ng/uL. Sin embargo, aun en el 50% de las muestras se observó todavía electroferogramas con ruido, posiblemente por el mismo problema antes detallado. Es así que la mejor manera para eliminar este problema fue clonar los fragmentos de ITS, ya que el clonamiento nos ayudaría a obtener un fragmento de ITS más limpio y con una concentración superior.

Dicho clonamiento se realizó con la finalidad de obtener una secuencia de buena calidad y concentración adecuada. El clonamiento de los productos de PCR se llevó a cabo mediante transformación bacteriana por electroporación. Y se utilizó el sistema pGEM® - T Easy Vector Systems de Promega® como vector de clonamiento, junto con células electrocompetentes (*E. coli* MAX Efficiency® DH5α™ de Invitrogen, genotipo de alta eficiencia de transformación).

Amplificación de ITS:

Las 84 muestras fueron nuevamente amplificadas, pero en volúmenes de 50uL, para obtener mayor cantidad de producto. Se realizó la separación de dichos productos mediante geles de agarosa al 3% en TBE 1X y teniendo pocillos más grandes. La visualización se realizó en una cámara de luz UV para poder observar fácilmente las bandas.

Purificación de los Productos:

Las bandas correspondientes al gen ITS (700bp) fueron cortadas a partir del gel y transferidas a tubos de 1.5mL estériles. Los geles cortados fueron purificados mediante el kit comercial Wizard® SV gel and PCR Clean-Up System

de Promega®, siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, se resuspendieron los ADN en 50uL de NFW y se congelaron a -20°C hasta su posterior uso.

Ligación de los productos de PCR (ITS):

Se realizó la ligación a partir de los productos de PCR purificados. En primer lugar, los productos de PCR fueron ligados al vector pGEM® - T según las condiciones del fabricante (Tabla 06). Finalmente, las muestras fueron conservadas a 4°C por toda la noche para una ligación exitosa.

Tabla 06: Condiciones de reacción de Ligación:

	Reacción Estándar	Control Positivo	Control Negativo
Buffer de ligación 2X	5uL	5uL	5uL
Vector pGEM® - T	1uL	1uL	1uL
Producto de PCR	XuL (*)	-	-
DNA Control de Inserto	-	2uL	-
T4 DNA Ligasa	1uL	1uL	1uL
NFW hasta el volumen final:	10uL	10uL	10uL

(*) el producto de PCR de las muestras se calculará teniendo en cuenta una proporción 1:5

Preparación de células electrocompetentes:

Se prepararon las células (*E. coli* DH5 α TM) partiendo de un stock madre. Se hizo incrementos siguiendo un protocolo para preparar células electrocompetentes. (Sambrock *et al.*, 2009)

Se utilizó un stock de células congeladas de la cepa DH5 α TM. Para reactivarla se sembró por agotamiento 5 - 10uL en una placa con Medio LB sólido (Triptona 10g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 10g/L y Agar 20g/L). Luego se incubó la placa a 37°C por una noche.

Después de incubar se procedió a picar una UFC (Unidad Formadora de Colonias) y se traspasó a un tubo de cultivo con 3mL de Medio LB líquido (Triptona 10g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 10g/L). De igual manera se incubó el tubo a 37°C en agitación por toda una noche.

Al mismo tiempo se prepararon 2 matraces erlenmeyer estériles con 250mL de Medio LB líquido. A continuación, se inoculó cada matraz con 1mL del cultivo a partir del tubo. Nuevamente se incubaron ambos matraces a 37°C en agitación a 200RPM hasta obtener un OD_(600nm) entre 0.5 - 0.7. Para evitar que el OD se pase del establecido se realizó mediciones por espectrofotometría cada hora.

Una vez alcanzado el OD_(600nm) necesario, se dividió el cultivo de cada matraz en 4 viales de 50mL. Luego se procedió a centrifugar los 8 viales a 4800RPM por 15 minutos a 4°C. Luego se eliminó el sobrenadante, con cuidado de no perturbar el pellet.

Seguidamente procedió a realizar los lavados (3 repeticiones en total) de las células con 25mL de Glicerol 10% estéril y frío. Por cada lavado se centrifugó los viales a 4800RPM por 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante entre cada repetición.

Finalmente, los pellets de cada vial se resuspendieron en 200uL de glicerol 10% estéril y frío, para luego hacer alícuotas de 80uL en tubos de 0.6mL. Todos estos tubos fueron congelados y almacenados a -80°C hasta su uso.

Transformación Bacteriana y Selección de Colonias:

La transformación bacteriana, se llevó a cabo por electroporación en un equipo Electroporator 2510 de Eppendorf®, según las especificaciones del fabricante. Este equipo nos permitió dar una descarga eléctrica sobre las bacterias a fin de que los plásmidos recombinantes (vector pGEM®-T más el inserto de ITS) puedan entrar en las células. Para este fin se utilizó el siguiente método según Sambrock (Sambrock *et al.*, 2009)

En primer lugar, se descongeló las células electrocompetentes sobre hielo (Alícuotas de 80uL), que se preparó un día antes. Se colocó sobre el hielo también el porta cubetas del electroporador y las cubetas que se usen.

Una vez que las células electrocompetentes fueron descongeladas por completo se colocó toda la alícuota (80uL) sobre los 10uL de plásmido recombinante. La mezcla fue homogenizada y se caloca dentro de la cubeta del electroporador y se incuba en hielo por 1 minuto.

Mientras se programan las condiciones de electroporación en el equipo (cubeta de 0.1cm, 1.8KV, 200ohm y 25uF), se colocó la cubeta, con la mezcla en

el porta cubetas. El porta cubetas se secó cuidadosamente y se colocó dentro del equipo para dar inicio al pulso eléctrico que duró aproximadamente 5ms.

Una vez electroporada la muestra, se retiró la cubeta del equipo y se le agregó inmediatamente 1mL de medio SOC (Tryptona 20g/L, Extracto de Levadura 5g/L, NaCl 1M, KCl 1M, Glucosa 20mM y MgCl 20mM) previamente calentado a 37°C. Se mezcló suavemente y se pasó el contenido completo de la cubeta a un tubo limpio de 1.5mL. Los nuevos tubos conteniendo las muestras fueron incubados en shaker para incubarlos por 1 hora a 37°C, en agitación lenta.

Luego del período de incubación las muestras fueron centrifugadas a 14000 RPM por 5 minutos. Se eliminó los sobrenadantes y se resuspendió los pellets de células en 200uL Medio LB líquido con ampicilina (100ug/mL). Finalmente se preparó placas de Medio LB/Amp/IPTG/X-gal (Sambrock *et al.*, 2009), y se procedió a sembrar las muestras resuspendidas en LB sobre dichas placas con ayuda de un asa de Digrafsky. Luego todas las placas se incubaron a 37°C por 1 día.

Estas placas nos ayudarán a seleccionar entre las bacterias que hayan incorporado exitosamente los plásmidos (colonias Blancas) y descartar las que no contiene ningún plásmido (colonias Azules). Para buscar los clones que contenían el vector con el inserto, a partir de las placas, se tomó con un asa estéril 1 UFC blanca, y otra azul como control, las cuales fueron sembradas en 5 ml de medio LB por 18 horas.

Extracción del ADN plasmídico:

Después de ser incubadas las UFC en los tubos de cultivo, se llevó a cabo una purificación del ADN plasmídico mediante el kit comercial Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit de ZYMO RESEARCH, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes de cada muestra se realizó una visualización por electroforesis, antes de ser enviados a secuenciar. Esta visualización se realizó con la finalidad de poder comprobar que el plásmido incorporó o no el inserto de interés (ITS). Si el plásmido tiene el inserto, se observa una banda más grande (700bp más grande) y si el plásmido no tiene el inserto, se observa una banda más pequeña (3000bp).

Secuenciamiento y Obtención de Secuencias Consenso:

Una vez que se comprobó que los plásmidos habían incorporado los insertos adecuados (gen ribosomal ITS), las 84 muestras fueron enviadas a MacroGen Korea para brindarnos el servicio de secuenciamiento. Los plásmidos fueron secuenciados en ambos sentidos para cada muestra. Los electroferogramas y las secuencias fueron analizados mediante los programas MEGA v 6.1 (Tamura K *et al.*, 2013) y ClustalX (Larkin MA *et al.*, 2007) para obtener las secuencias consenso. La especificidad de las secuencias se comprobó por comparación con secuencias depositadas en GenBank, provisto por la NCBI, (Nacional Center for Biotechnology Information;) mediante el algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1990).

3.2.6. Análisis bioinformático:

El análisis bioinformático fue hecho a partir de las secuencias consenso obtenidas para la región parcial del gen de ribosomal ITS, de las 84 muestras. Se consideró aquellas muestras que mostraban un electroferograma con excelente calidad. Para todos los análisis subsecuentes en este apartado se elaboró un archivo de entrada (.txt), el cual contenía las secuencias de las 84 muestras en formato .FASTA.

Estimación de las Distancias Genéticas:

El cálculo de las distancias se realizó mediante la comparación de pares de haplotipos, utilizando en primera instancia la distancia p, y posteriormente los siguientes modelos de sustitución nucleotídica: Jukes-Cantor (JC), Jin-Nei (JN), Kimura dos Parámetros (K2P) y Tajima & Nei (TN84). Los cálculos de las distancias fueron ejecutados en DARwin 6.0.1.0 (Perrier *et al.*, 2003) y también en MEGA v 6.1 (Tamura *et al.*, 2013)

La construcción de los dendrogramas en base a las distancias genéticas se hizo con ayuda del programa MEGA 6.1 (Tamura *et al.*, 2013) Para observar qué tan relacionados están las muestras, se utilizó un análisis inferido por el método de UPGMA.

Estimación de la Variabilidad Genética:

La variabilidad genética de las secuencias obtenidas a partir de las urediniosporas de *Puccinia striiformis*, se caracterizó a través del cálculo de tres

índices con ayuda del programa DnaSP v5.10 (Librado P. Rozas J, 2009): diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica y estimador de Watterson.

Estimación de Parámetros Demográfico:

El análisis demográfico se realizó mediante 2 pruebas de neutralidad diferentes:

- Prueba de Tajima (D_T):

En el presente trabajo el cálculo de la prueba de Tajima se realizó mediante DNAsp 5.10 (Librado P. Rozas J, 2009). La significancia estadística de la D de Tajima se obtuvo en este programa a partir del método analítico original de Tajima (Tajima F, 1989) y utilizando simulaciones coalescentes (5.000 réplicas) basándose en el número de sitios segregantes (S). A partir de estas simulaciones, se obtuvo el intervalo de confianza del 95% para el valor de D_T .

- Prueba de Fu (F_s):

El cálculo de la prueba FS de Fu, en el presente trabajo, se realizó mediante DNAsp 5.10 (Librado P. Rozas J, 2009). La significancia estadística se obtuvo utilizando simulaciones coalescentes (5.000 réplicas) sobre la base del número de sitios segregantes (S).

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA):

La existencia de estructura genética entre poblaciones de *Puccinia striiformis* se infirió mediante un AMOVA realizado en el programa Arlequin

3.5.1.3 (Excoffier L. Lischer HEL, 2010). Este análisis se corrió para ambas sub-poblaciones de *P. striiformis* (n= 2).

Se realizó una comparación pareada entre ambas sub-poblaciones (zonas geográficas) utilizando el estadístico F_{ST} a los efectos de determinar las poblaciones con mayor diferenciación genética.

IV. RESULTADOS

4.1. Colecta de Material Biológico

Una vez que se realizó las colectas, se elaboró una tabla conteniendo todos los datos de las muestras como la distribución geográfica y se asignó un código para cada muestra. (Tabla 07)

Para poder facilitar el estudio se preparó un mapa con las diferentes zonas de muestreo (Figura 07)



Figura 07: Mapa de Colecta de Muestras. Muestra los principales lugares (5 provincias diferentes) de colecta de la región norte de Ayacucho

Tabla 07. Ubicación geográfica de las muestras utilizadas en el estudio:

Muestra	Provincia	Distrito	Pueblo
GRU001	Huanta	Huamanguilla	Ccochachin
GRU002	Huanta	Ayahuanco	Vista Alegre

GRU003	Huanta	Ayahuanco	Vista Alegre
GRU004	Huanta	Ayahuanco	Vista Alegre
GRU005	Huanta	Ayahuanco	Vista Alegre
GRU006	Huanta	Huamanguilla	Ccochachin
GRU007	Huanta	Huamanguilla	La Vega
GRU008	Huanta	Huamanguilla	La Vega
GRU009	Vilcashuaman	Vischongos	Pueblo Libre
GRU010	Vilcashuaman	Vischongos	Pueblo Libre
GRU011	Vilcashuaman	Vischongos	Vischongos
GRU012	Huanta	Huamanguilla	La Vega
GRU013	Huamanga	Chiara	Chupas
GRU014	Huamanga	Vinchos	Vinchos
GRU015	Huamanga	Socos	Rancha
GRU016	Huamanga	Socos	Socos
GRU017	Huamanga	Socos	Socos
GRU018	Huamanga	Socos	Socos
GRU019	Huamanga	Socos	Socos

GRU020	Huamanga	Socos	Socos
GRU021	Huamanga	Socos	Socos
GRU022	Huamanga	Quinoa	Vista Alegre
GRU023	Huamanga	Socos	Huascahura
GRU024	Huamanga	Socos	Huascahura
GRU025	Huamanga	Socos	Rancha
GRU026	Huamanga	Acocro	Matara
GRU027	Huamanga	Carmen Alto	Yanama
GRU028	Huamanga	Chiara	Chiara
GRU029	Huamanga	Chiara	Chupas
GRU030	La Mar	San Miguel	Pariahuanca
GRU031	La Mar	San Miguel	Pariahuanca
GRU032	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU033	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU034	La Mar	San Miguel	Llaquapampa
GRU035	La Mar	San Miguel	Pariahuanca
GRU036	La Mar	San Miguel	Yatanccasa

GRU037	Vilcashuaman	Vischongos	Chaucococha
GRU038	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU039	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU040	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU041	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU042	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU043	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU044	Huamanga	Socos	Socos
GRU045	Huamanga	Socos	Socos
GRU046	Huamanga	Vinchos	Arizona
GRU047	Huamanga	Vinchos	Casacancha
GRU048	Huanta	Huamanguilla	La Vega
GRU049	Huanta	Huamanguilla	La Vega
GRU050	Huanta	Huamanguilla	Marayniyoq
GRU051	Huanta	Huamanguilla	Marayniyoq
GRU052	Huanta	Huamanguilla	Marayniyoq
GRU053	Huanta	Huamanguilla	Marayniyoq

GRU054	La Mar	San Miguel	Cuypampa
GRU055	Huamanga	Chiara	Huallqaoukro
GRU056	Huamanga	Chiara	Huallqaoukro
GRU057	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU058	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU059	Huamanga	Chiara	Huallqaoukro
GRU060	Huamanga	Chiara	Esquinera
GRU061	Huamanga	Chiara	Huallqaoukro
GRU062	Huamanga	Chiara	Huallqaoukro
GRU063	Huamanga	Chiara	Huayqo
GRU064	Huamanga	Chiara	Huayqo
GRU065	Huamanga	Chiara	Pampa Chupas
GRU066	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU067	Huamanga	Chiara	Pampa Chupas
GRU068	Cangallo	Morochucos	Suca
GRU069	Huanta	Huamanguilla	La Vega
GRU070	Huanta	Huamanguilla	La Vega

GRU071	Huanta	Huamanguilla	La Vega
GRU072	Huanta	Huamanguilla	La Vega
GRU073	La Mar	San Miguel	Llaquapampa
GRU074	La Mar	San Miguel	Llaquapampa
GRU075	La Mar	San Miguel	Llaquapampa
GRU076	La Mar	San Miguel	Llaquapampa
GRU077	Huamanga	Vinchos	Vinchos
GRU078	Huamanga	Vinchos	Ccayhuapampa
GRU079	Huamanga	Vinchos	Chillka Orcco
GRU080	Huamanga	Vinchos	Suyruccpata
GRU081	Huamanga	Vinchos	Suyruccpata
GRU082	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU083	Huamanga	Quinoa	Muruncancha
GRU084	Huamanga	Quinoa	Muruncancha

4.2. Amplificación del Gen ITS en los Individuos:

4.2.1. Aislamiento de urediniosporas

La cantidad de urediniosporas que se logró obtener, mediante el aislamiento, fue de 10 a 50ug, por muestra de tejido foliar. Las muestras que

dieron baja cantidad de urediniosporas fueron repetidas para generar mayor inóculo. Se estableció como mínimo 50ug de inóculo por muestra antes de proceder a la extracción de ADN.

4.2.2. Extracción, cuantificación, y dilución del ADN genómico:

La extracción de ADN resultó ser bastante eficiente. Se logró obtener concentraciones de rangos entre 40 y 150ng/uL a partir de los aislamientos de esporas. Las medidas de las absorbancias fueron determinadas por espectrofotometría. También se evaluaron las relaciones de absorbancias a 260nm/280nm y 260nm/230nm para determinar la posible contaminación de las muestras.

Con respecto a la relación A260/A280 se aceptaron como muestras de buena calidad, aquellas cuyos valores estuvieron entre 1.70 a 1.99. Las muestras con valores menores de 1.7 nos indican contaminación con proteínas por lo que se descartaron y se repitió la extracción. Mientras que las muestras con valores mayores de 1.99, indican contaminación por alcoholes, de igual forma fueron eliminadas y repetidas. El 80% de las muestras obtuvieron ADN de buena calidad con valores entre 1.75 y 1.95. El otro porcentaje de las muestras (20%) fue reprocesado ya que tenían contaminación proteica o por alcoholes. Aquellas muestras contaminadas con proteínas se volvieron a extraer hasta obtener un valor aceptable, pero las muestras contaminadas con alcoholes simplemente fueron precipitadas y lavadas nuevamente hasta entrar en el rango aceptable.

Por otra parte, en la relación de absorbancias A260/A230 se tomó en cuenta valores de 1.8 a 2.0 como aceptables. En este caso los valores por debajo

de 1.8 son un indicativo de contaminación por sales o restos orgánicos. En este caso las muestras en su totalidad tuvieron valores entre 1.8 y 2.0. Por lo tanto, las muestras no tuvieron que descartarse y repetirse según este parámetro.

Cabe resaltar que estas acciones se tomaron para evitar que los procedimientos subsecuentes (como las reacciones de PCR) sean inhibidos por algún tipo de contaminante. Después de ser cuantificadas las 84 muestras, y evaluado su nivel de pureza y calidad, estas fueron diluidas con NFW hasta llegar a una concentración de 20ng/uL.

Finalmente, las muestras diluidas fueron visualizadas mediante electroforesis para poder observar posibles problemas de degradación del ADN. En ninguna muestra se observó signos de fragmentación del ADN (Figura 08). Por lo tanto, las muestras quedaron listas para los siguientes ensayos.

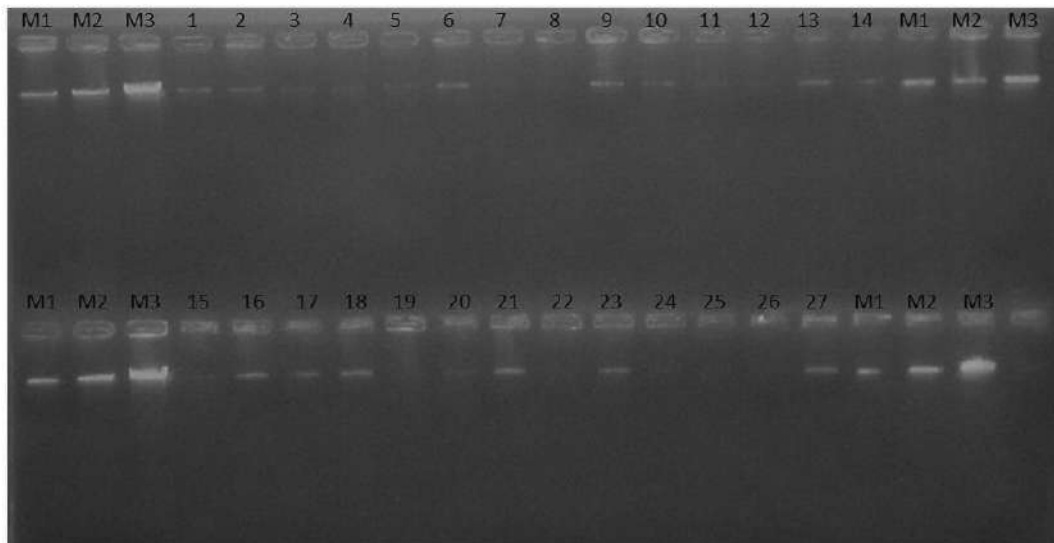


Figura 08: Gel de electroforesis (referencial) mostrando las muestras de ADN purificadas. Electroforesis en gel de agarosa al 1%: se observan algunas muestras de ADN diluidas aproximadamente en 20ng/uL, con sus respectivos

gradientes de concentración en los marcadores, siendo M1: 20ng/uL, M2: 50ng/uL y M3: 100ng/uL.

4.2.3. Amplificación de ITS:

Se amplificó ITS con las condiciones adecuadas (Figura 09), y se puede observar una banda única y bien definida a unos 700bp aproximadamente dependiendo de la muestra. Se reamplificó las muestras que amplificaron correctamente ITS, pero en un volumen de 50uL para poder obtener una mayor cantidad de producto que luego pueda ser purificado, clonado y secuenciado.

Antes de proceder con el clonamiento, los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa, para evidenciar las bandas discretas para cada muestra. (Figura 10)

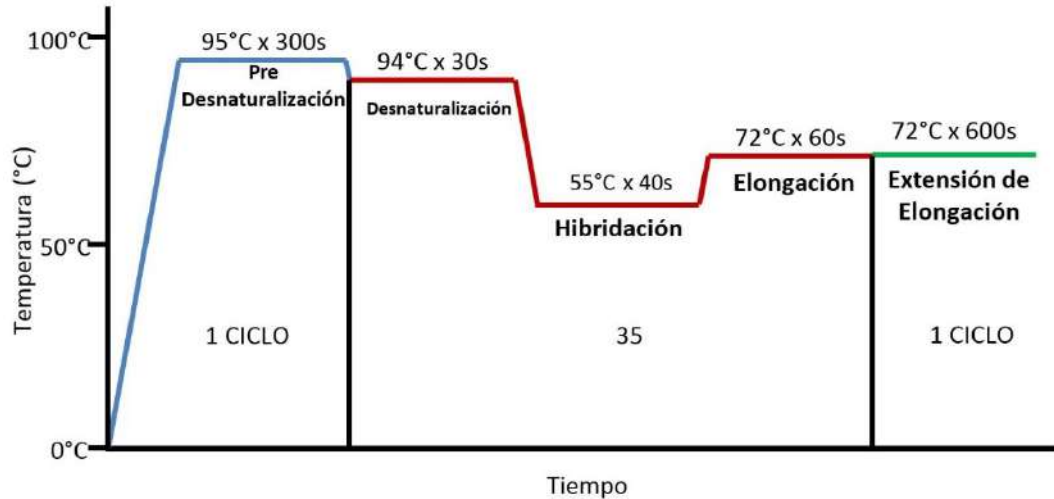


Figura 09: Condiciones Estandarizadas de la PCR para amplificar regiones ITS

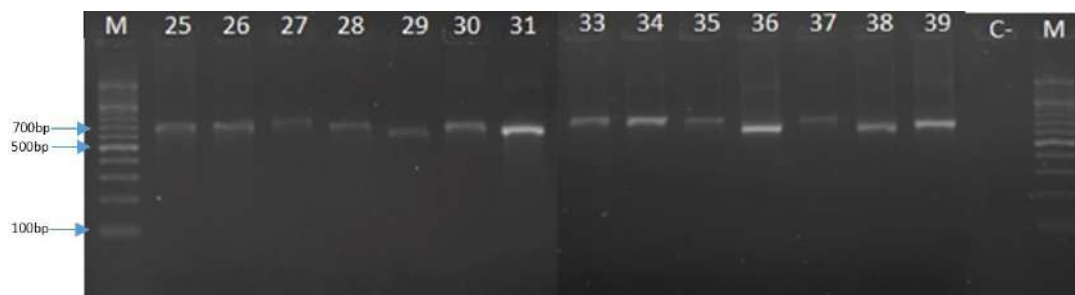


Figura 10: Gel de electroforesis (referencial) mostrando productos de ITS amplificados por PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%: Se observan los fragmentos de ITS (700bp), las muestras corresponden a algunas de las 84 muestras. Como marcador se utilizó 100bp ladder.

4.3. Clonamiento, transformación y secuenciamiento:

4.3.1. Purificación, ligación y transformación de ITS:

Una vez que se amplificó el gen ITS en todas las muestras considerando un volumen final de reacción de 50uL, el producto resultante, una banda de ADN de 700bp, se purificó y ligó con el vector pGEM®-T. A partir de esta ligación se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5α™ en las placas de LB/Amp/IPTG/X-gal.

4.3.2. Selección de UFC transformadas:

Cada muestra fue sembrada en 2 placas LB/Amp/IPTG/X-gal con diferentes concentraciones del inóculo, a fin de poder aislar bien las colonias. Una vez las colonias crecieron, se seleccionó 1 sola UFC (unidad formadora de colonia) blanca y otra colonia azul.

Cada colonia fue picada y sembrada en tubo de cultivo con 5mL de medio LB y Ampicilina. Inmediatamente se incubaron los tubos en el equipo MaxQ™

8000 Incubated Stackable Shakers de Thermo Scientific™ a 37°C con 220RPM de agitación por 24 horas (figura 11).



Figura 11: Placas de LB/Amp/IPTG/X-Gal con las muestras transformadas sembradas. Se puede observar placas referenciales de 2 muestras al azar en donde se ve la diferencia entre colonias blancas de azules, donde las colonias blancas son las que tiene el inserto de interés (ITS) dentro de las bacterias, esto gracias al marcador de selección LacZ.

4.3.3. Extracción de plásmidos y secuenciamiento:

Después que fueron incubados los tubos con las muestras en medio LB, se procedió a extraer los plásmidos recombinantes (*i.e.* plásmidos que contenían el inserto de interés). La extracción o purificación de los plásmidos se realizó mediante el kit comercial Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit de ZYMO RESEARCH, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para comprobar la concentración y la calidad se preparó un gel de electroforesis al 1.5% en TBE 1X, para visualizar las bandas correspondientes al ADN plasmídico (Figura 12).

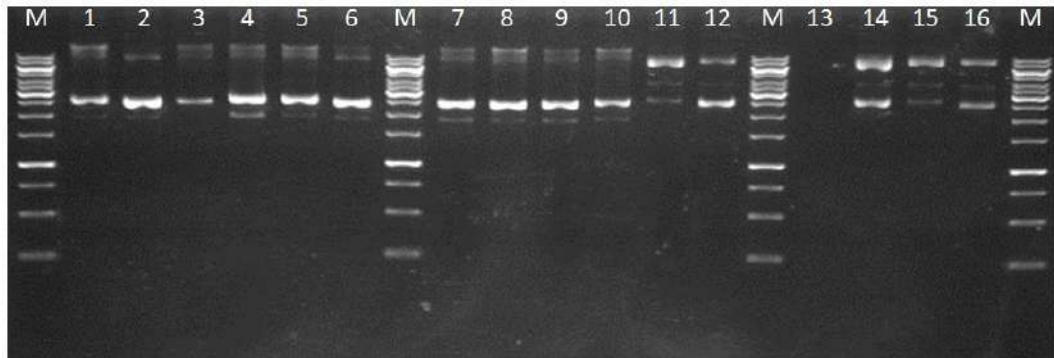


Figura 12: Gel de electroforesis (referencial) de las muestras de ADN plasmídico purificadas. Electroforesis en gel de agarosa al 1%: Se observan los plásmidos que se purificaron, las muestras 1 – 16 corresponden a las muestras cuyos plásmidos fueron purificados con un peso de 3700bp, mientras que el marcador que se utilizó fue 1Kbp ladder.

Finalmente, para confirmar la naturaleza del fragmento clonado se procedió con el secuenciamiento (Figura 13), antes de proceder a la parte bioinformática.

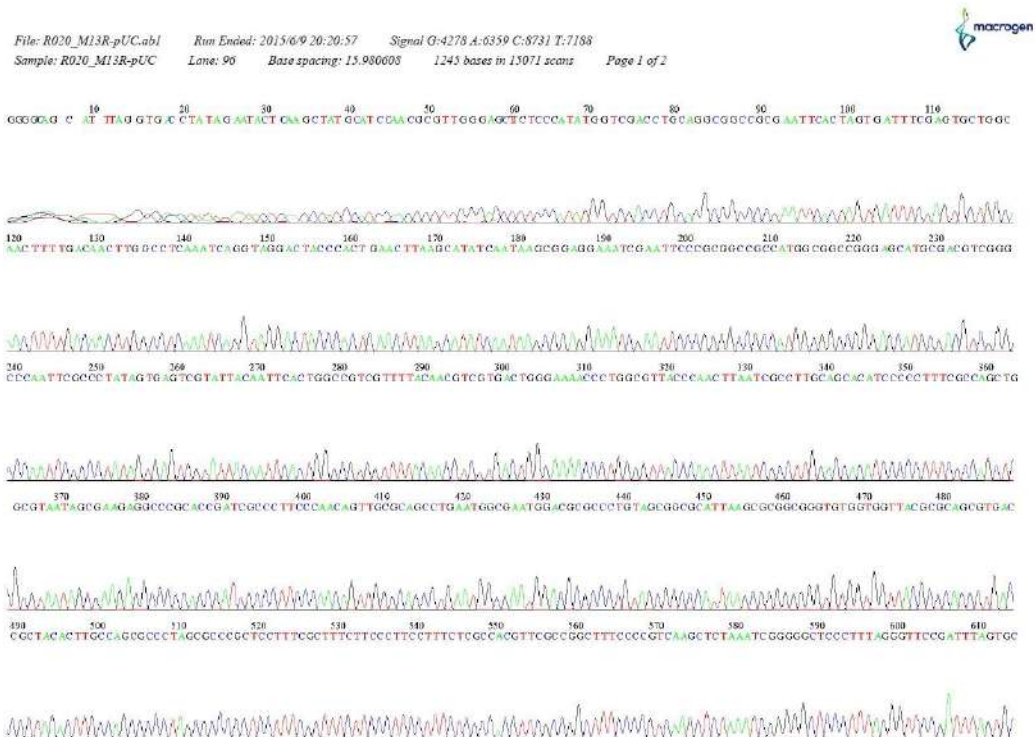


Figura 13: Electroferograma de una muestra de ITS. Ejemplo del archivo correspondiente a un electroferograma de buena calidad de una muestra de plásmido recombinante conteniendo el fragmento de ITS.

4.4. Análisis Bioinformático:

4.4.1. Alineamiento y composición de las secuencias:

Las secuencias se editaron manualmente con ayuda del programa MEGA 6, dejando las secuencias consenso de 696bp para todos los individuos, no se observaron gaps, pero si sustituciones nucleotídicas. Los resultados del BLAST determinaron que las 84 muestras, alinean correctamente con ITS de *Puccinia striiformis* del Genebank.

La composición nucleotídica de las 84 secuencias estuvo determinada mediante el programa MEGA 6 y se mostraron en la siguiente tabla determinando

también el porcentaje de sustitución (transiciones o transversiones) y su probabilidad de sustitución. (Tabla 08)

Tabla 08: Composición de las sustituciones nucleotídicas en las secuencias

Maximum Composite Likelihood Estimate of the Pattern of Nucleotide Substitution				
	A	T	C	G
A	-	6.24	3.32	14.52
T	6.23	-	6.66	3.19
C	6.23	12.52	-	3.19
G	28.34	6.24	3.32	-

4.4.2. Estimación de las distancias genéticas:

Luego de los alineamientos se analizó las distancias genéticas perteneciente a la región ITS (700bp), de los 84 individuos de Roya amarilla de cebada. En primer lugar, se determinaron los sitios polimórficos, para poder encontrar los diferentes haplotipos presentes en la población. Con ayuda del programa DARwin, se convirtieron los datos de secuencia en una matriz que pueda ser leída por el programa. Luego dicha matriz fue utilizada para generar los dendogramas en base a las distancias genéticas, según los diferentes modelos matemáticos.

Se realizó la matriz pareada a partir de las distancias genéticas estándar y a continuación se generó un dendograma mediante el método de UPGMA (Figura 15) Claramente se muestran en dicho dendograma 2 grupos genéticos bien marcados, inferidos a partir de las 84 muestras en base a los SNPs encontrados.

El primer grupo está representado por muestras mayoritariamente de la zona más al norte de Ayacucho (Figuras 14 y 15). Mientras que el grupo 2 se

distribuye en las provincias de Huamanga, La Mar, Vilcashuamán y Cangallo, situados en el centro de Ayacucho (Figuras 14 y 15). En total se logró determinar 6 diferentes haplotipos, de los cuales 2 de ellos se les denominaron como Subpoblación Norte, mientras que se encontraron 4 diferentes haplotipos, que se denominaron como Subpoblación Centro (Figura 14).

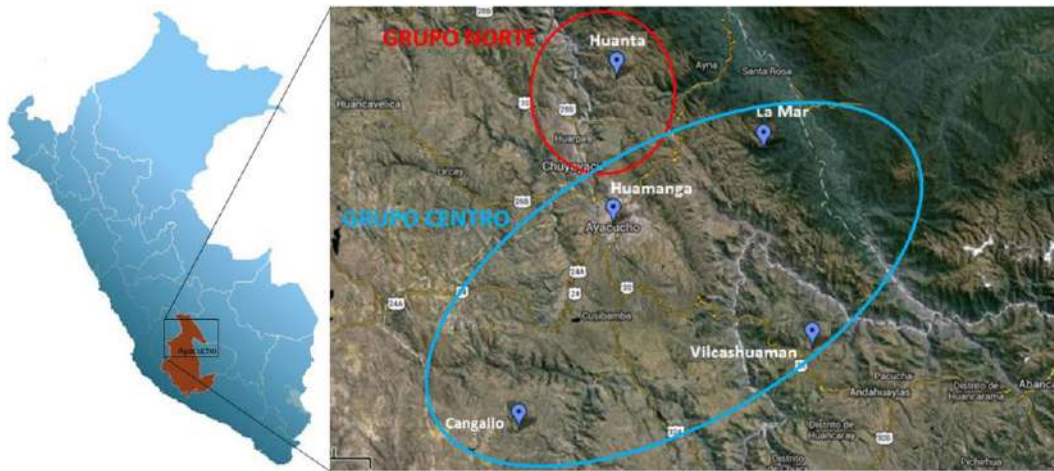


Figura 14: Distribución Geográfica de las muestras de Royá Amarilla de Cebada. Esta distribución se realizó en base a las distancias genéticas que nos dio el Dendograma.

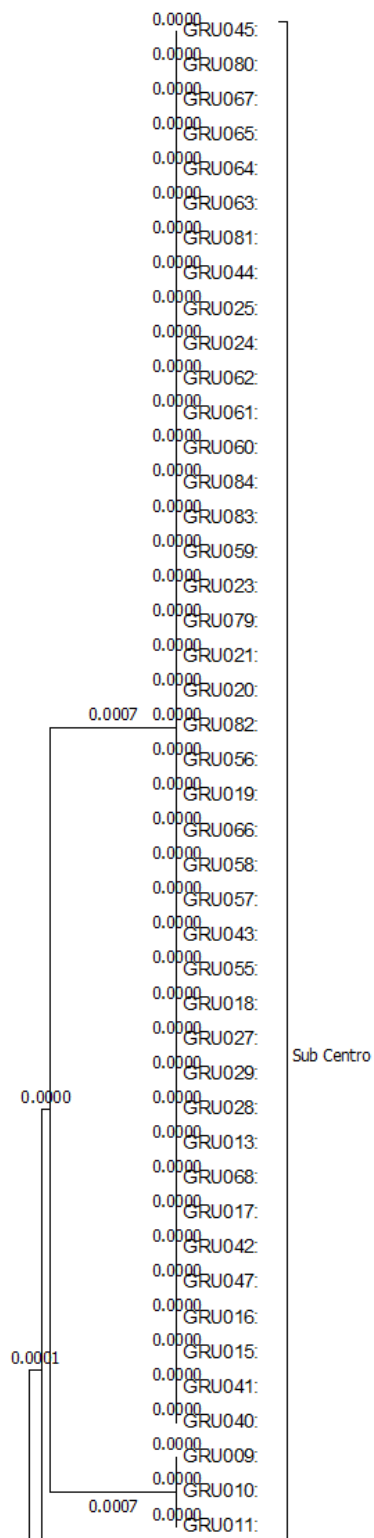


Figura 15. Dendrograma inferido mediante el enfoque UPGMA de todas las muestras de roya amarilla de cebada

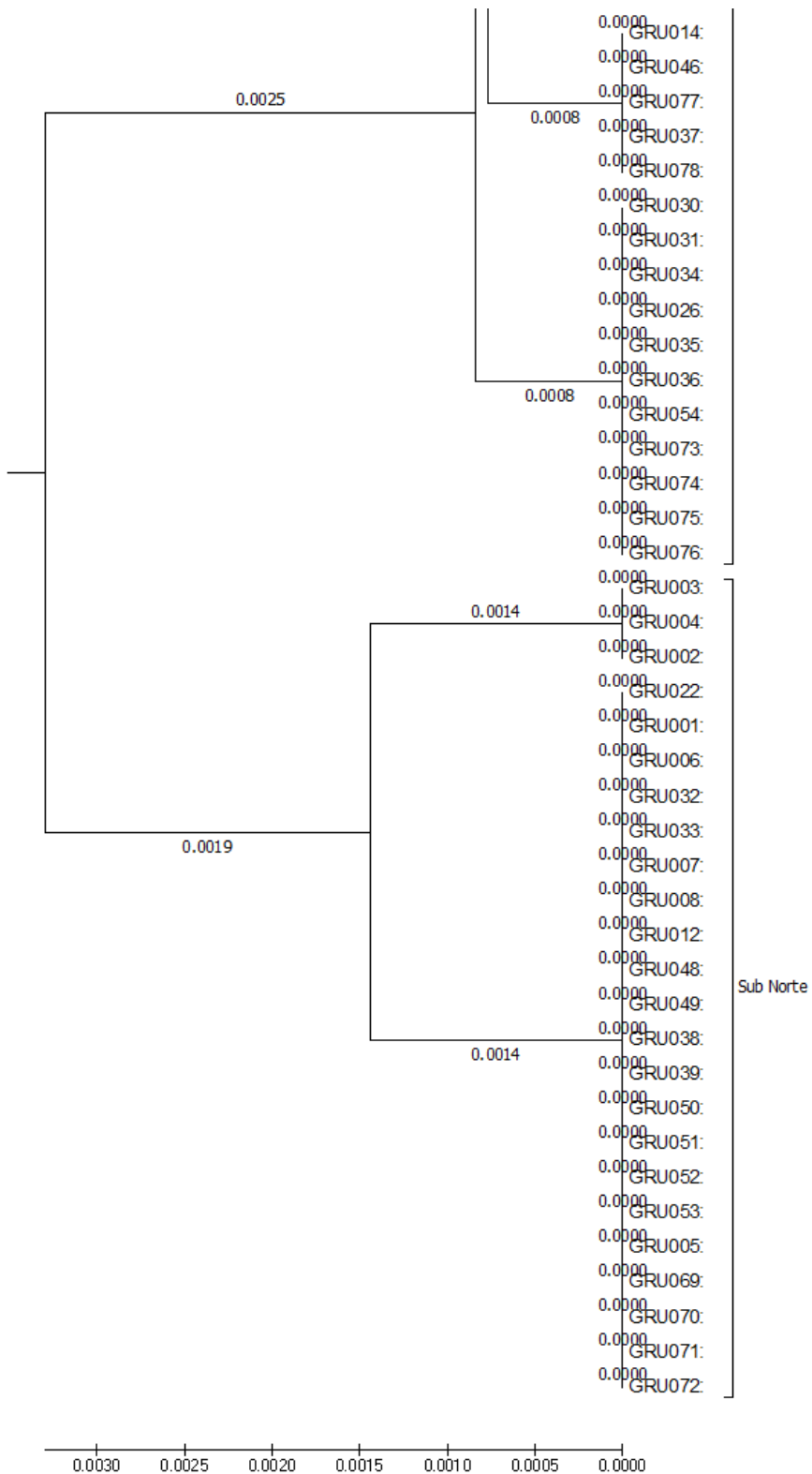


Figura 15. Dendrograma inferido mediante el enfoque UPGMA de todas las muestras de roya amarilla de cebada (continuación)

4.4.3. Estimación de la variabilidad genética:

Los valores de Diversidad haplotípica (HD), diversidad nucleotídica (π), por subpoblación y totales para *Puccinia striiformis* se presentan en la siguiente tabla (Tabla 09). Asimismo, se determinaron las frecuencias haplotípicas de cada uno de los haplotipos encontrados en las 2 subpoblaciones. (Tabla 10 y Figura 16)

Una vez que se determinaron los 6 diferentes haplotipos también se ubicaron los 9 diferentes sitios polimórficos que se encontraron en las 84 secuencias, dentro de las regiones del gen correspondientes. (Figura 17)

Tabla 09. Estadísticos obtenidos de las secuencias ITS

	N	h	$H_D \pm DS$	π	S	θ_s	D_T	F_s
Norte	24	2	0.228 \pm 0.102	0.00066	2	0.00077	-0.32459*	1.333*
Centro	60	4	0.498 \pm 0.067	0.00080	3	0.00092	-0.26784*	-0.458*
Total	84	6	0.684 \pm 0.038	0.00317	9	0.00259	0.57807*	2.280*

N: tamaño de la muestra; h: número de haplotipos; H_D : diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica; S: número de sitios polimórficos; θ_s : theta calculado a partir de S; D_T : D de Tajima (π vs. θ); F_s : F_s de Fu; DS: Desviación estándar; * valores NO significativos.

Tabla 10: Frecuencias haplotípicas dentro de las 2 Sub-Poblaciones

Sub Poblaciones	Haplotipo	Frecuencia Haplotípica
Sub Poblacion Centro (n=60)	Haplotipo 1 (n=41)	68%
	Haplotipo 2 (n=3)	5%
	Haplotipo 3 (n=5)	8%
	Haplotipo 4 (n=11)	19%
Sub Poblacion Norte (n=24)	Haplotipo 5 (n=3)	12%
	Haplotipo 6 (n=21)	88%

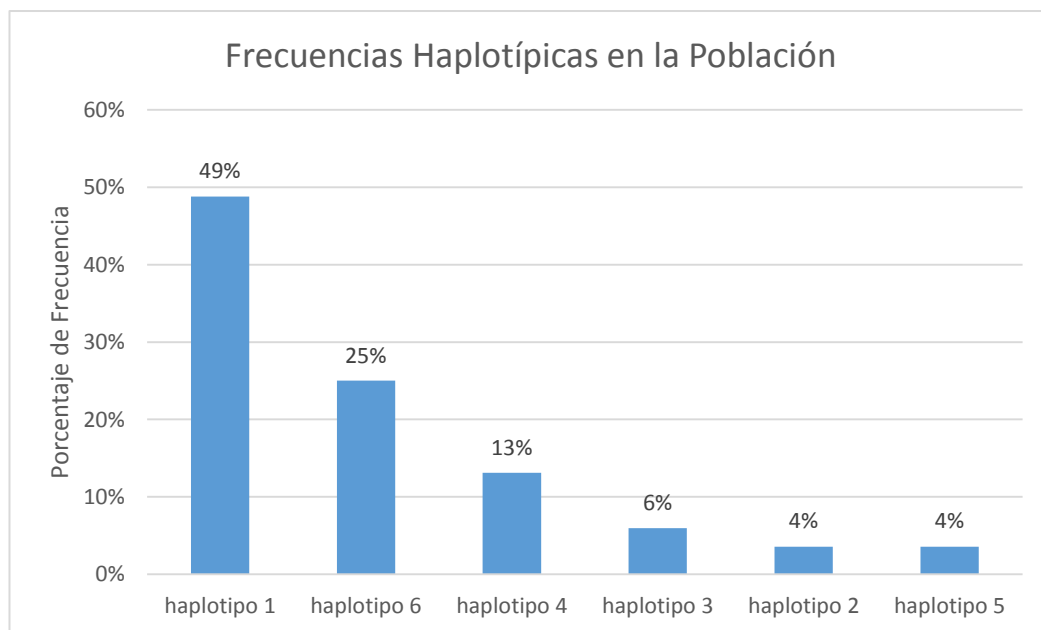


Figura 16: Frecuencias Haplotípicas en la población de *Puccinia striiformis* en Ayacucho

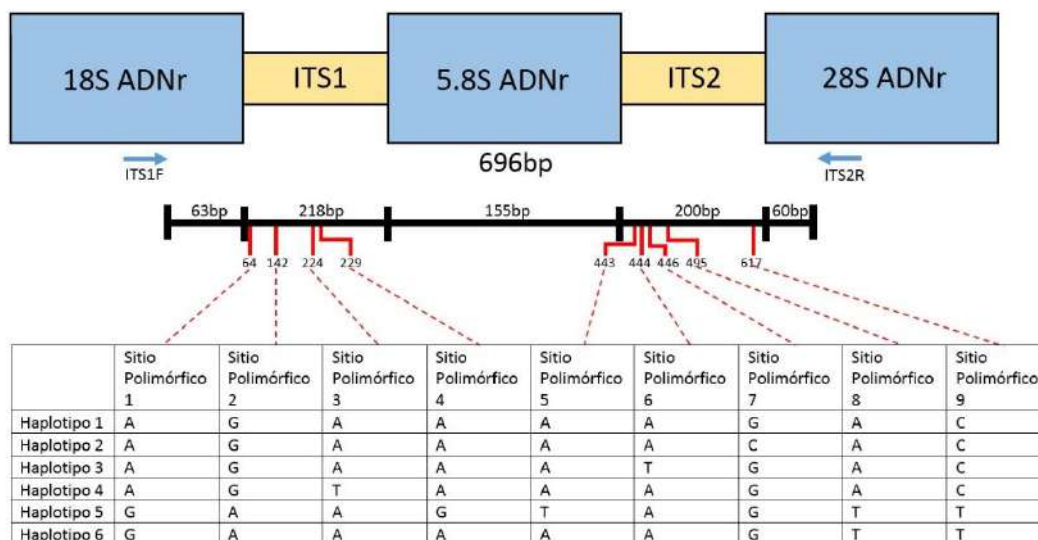


Figura 17: Ubicación de los Sitios Polimórficos dentro del gen ribosomal

4.4.4. Análisis demográfico:

Ninguna de las pruebas de neutralidad evaluadas (i.e. D_T de Tajima y F_S de Fu) resultó estadísticamente significativa, por lo cual no fue posible detectar huellas de posibles eventos demográficos a partir de estos estimadores. Los resultados de las pruebas se presentan en la Tabla 09.

4.4.5. Análisis de varianza molecular (AMOVA):

La población fue dividida en dos grupos (Sub-Población Norte y Sub-Población Centro), teniendo en cuenta la regionalización geográfica, a partir del resultado de las distancias genéticas. (Ver Figura 14 y 15). Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que existe una variación leve (11.52%) que se encuentra dentro de las Subpoblaciones. Mientras que existe una mayor variación (88.48%) entre los grupos del Norte y Centro. (Tabla 11)

Tabla 11. Análisis de Varianza Molecular para las 2 Sub-poblaciones de Roya
Amarilla de Cebada

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Poblaciones	1	69.845	2.02945	88.48
Dentro de Poblaciones	82	21.667	0.26423	11.52
Total	83	91.512	2.29367	
Índice de Fijación Fst:			0.8848	

V. DISCUSIÓN

El análisis genético en poblaciones de patógenos es fundamental para el entendimiento de los mecanismos que gobiernan, la variación genética, la coevolución hospedero-patógeno y el manejo de resistencia. (Aradhya *et al.*, 2001) En este contexto los marcadores moleculares han sido utilizados ampliamente para caracterizar las poblaciones de hongos patógenos de plantas, en particular para la evaluación de la diversidad genética, relaciones filogenéticas y la caracterización de patotipos. (Majer *et al.* 1996, Arenal *et al.*, 1999).

El presente estudio, muestra la primera aproximación de la variabilidad genética de Roya amarilla de cebada (*Puccinia striiformis*) en el Perú. Existen pocos antecedentes, sobre estudios en variabilidad genética en royas de cereales. Sin embargo, los pocos estudios apuntan a investigar la variabilidad de royas en trigo. (Hovmøller MS *et al.*, 2011) Dichos resultados muestran la existencia de niveles altísimos de diferenciación genética entre grupos de especies. (Keiper FJ *et al.*, 2003) Este grado alto de diversidad genética podría estar explicado por el tipo de reproducción sexual que tiene la roya amarilla en su ciclo de vida. (Chen W *et al.*, 2014; Hovmøller MS *et al.*, 2011)

5.1. Extracción, Concentración Y Pureza Del Material Genómico

En los estudios moleculares, cuyo objeto de estudio sean hongos, un paso fundamental es la obtención de un material genético adecuado, de buena calidad y en la concentración adecuada. Más aún si se desea trabajar con hongos patógenos de plantas, como las royas. Las royas en general, tales como la roya amarilla, roya

de la hoja o roya del tallo, son patógenos de cereales y pastos, los cuales son biotrofos obligados. (Hovmøller MS *et al.*, 2011) Esta característica los hace complejos de aislarlos y propagarlos, ya sea en medios sólidos o líquidos en laboratorio (Roelfs *et al.*, 1992)

Es por ello que obtener inóculos abundantes de esporas de roya amarilla es casi imposible. Esto limita el acceso al ADN de estos hongos, ya que al no haber inóculo suficiente la purificación de ADN suele ser poco eficiente e insuficiente.

Las posibles soluciones frente a este problema, serían realizar la extracción mediante kits comerciales o utilizar métodos de cultivos mono-pustulares, también conocidos como monospóricos. La adquisición de kits comerciales los cuales se basan en el método de amplificación de genomas enteros (WGA, whole genome, amplification) a partir de una sola espora o célula, son una buena opción, aunque es muy costosa. (Wang Y *et al.*, 2009)

Otra solución sería utilizar métodos de cultivos mono-pustulares, que se basan en aislamiento y propagación de esporas a partir de una sola pústula. Sin embargo, este método demanda demasiado tiempo, y obtener las plantas de cebada que sean altamente susceptibles a roya no es fácil en el Perú. Por otro lado, se debe contar con ambientes especiales, lo suficientemente amplios como los invernaderos o cuartos de cultivo, para la propagación. Sumado a esto el hecho que propagar unas 5 muestras demandarían al menos 30 días. Si bien este método es muy usado en patógeno biótrofos obligados, por su eficiencia de aislamiento, se convierte en un arma de doble filo, ya que todo el proceso puede ser laborioso y altamente demandante, convirtiéndolo en otra limitante y no una solución. (Roelfs *et al.*, 1992)

Por los motivos antes expuestos es que se tuvo que idear un método más sencillo, práctico y que no demande tanto tiempo, para el aislamiento de esporas de Roya, antes de proceder con la extracción de ADN. En un inicio se realizó la extracción de ADN directamente de las hojas de cebada que presentan pústulas de roya amarilla. Sin embargo, este método no resultó adecuado, debido a que al amplificar la región ITS, los primers al ser universales amplificaban con mayor especificidad ITS de cebada y no el de roya.

Finalmente se ideó aislar las esporas de roya a partir de las pústulas que presentaban las hojas mediante centrifugación, tal como se describe en la metodología. Este método resultó ser eficaz, rápido y barato. Pese a todo, el inconveniente que se tuvo fue que, algunas muestras solo contaban con una única hoja de colecta o las pústulas por hoja eran mínimas (aproximadamente 10-20). Entonces luego de la centrifugación, se obtuvieron pellets que contenían pocas esporas, de los cuales la extracción de ADN, resultó en concentraciones bajísimas y de mala calidad.

Otro punto que cabe resaltar con respecto a este método fue que las muestras de hojas con lesiones (pústulas), tenían que ser lo más frescas posibles. Ya que las muestras de 2 o más años aunque estuvieran bien conservadas, presentaban el tejido vegetal en buen estado, pero las pústulas estaban secas con las esporas muertas. (Rodríguez D, 2007)

En conclusión, este método tuvo resultados satisfactorios ya que, de un total de 120 muestras, 84 terminaron en una purificación de ADN exitosa, de buena concentración y buena calidad. Las otras 36 muestras no se incluyeron en el

estudio, debido a que: a) el material fúngico estaba deteriorado por el tiempo; b) la extracción del material genético tuvo baja concentración y baja calidad.

5.2. Amplificación Y Clonamiento De ITS

Teniendo ya un buen material genético, de buena calidad y con una dilución adecuada. Se estandarizó correctamente las condiciones de la PCR y se amplificaron los ITS en la población completa. Cabe mencionar que si bien los primers elegidos, son ampliamente utilizados como universales para hongos, se decidió estandarizarlos para corroborar las condiciones de la PCR descritas en la literatura. (White *et al.*, 1990; Wang Y *et al.*, 2009)

5.3. Alineamiento e Identificación de Secuencias

La región ITS del gen nuclear del ARNr ha sido utilizada como blanco para la identificación de especies microbianas porque es lo suficientemente variable para ser usada como región específica de especie. (Slemmons *et al.* 2013)

Si bien los ITS son utilizados ampliamente para la identificación molecular a nivel de género (Liu M. y Hambleton S, 2010), en este estudio se pudo realizar la identificación de las muestras hasta el nivel de especie debido que todas las muestras colectadas procedían únicamente de cultivos de Cebada infectados con roya amarilla. Es decir que las muestras sufrieron una identificación previa durante la colecta, en base a su sintomatología en la planta. Sin embargo, muchas veces los signos de la enfermedad por roya amarilla y roya de la hoja suelen confundirse en sus etapas tempranas de infección. Este caso se encontró en algunas de las muestras ya que al realizar la identificación molecular

alrededor de 20 muestras resultaron tener un porcentaje de similitud del 100% con *Puccinia hordei*, que es el hongo causal de Roya de la Hoja en cereales.

Las secuencias completas de las regiones ITS1-5.8S-ITS2, se obtuvieron para todas las muestras. Pero cabe aclarar que estos fragmentos contienen 62 pares de bases del extremo final del gen *18S* y 60 pares de bases del extremo inicial del gen *28S*. El tamaño de la región amplificada obtenido concuerda con los datos obtenidos por otros autores para el género *Puccinia* (Liu M. Hambleton S, 2010)

Estas secciones iniciales y terminales, respectivamente, de las subunidades pequeña (18S) y grande (28S) de los genes ribosomales, no se eliminaron, pese a ser lo recomendado en muchos estudios con marcadores ribosomales similares. Esto se hizo para poder evidenciar que en dichas subunidades permanecen conservadas dentro de la especie, y no se encontraron sitios polimórficos en dichas regiones. (Nilsson *et al.* 2008).

La identificación de las muestras mediante el BLAST mostró que las 84 muestras incluidas en el estudio obtuvieron una cobertura entre el 97 - 100% y una similitud del 80 - 100% con secuencias del genbank pertenecientes a *Puccinia striiformis* (Roya Amarilla).

De las 84 secuencias que se lograron identificar, que mostraron una correspondencia con Roya amarilla de cebada, al ser alineados se observaron variaciones de un nucleótido (SNPs) en las regiones que corresponden al ITS1 y la región ITS2, pero no se encontraron variaciones en las regiones de las 3 diferentes subunidades también analizadas: 18S, 5.8S y 28S. Esto estaría fuertemente apoyado por estudios que afirman que las regiones ITS1 e ITS2 son regiones que evolucionan a través del tiempo rápidamente entre especies. Lo contrario ocurre

con las regiones correspondientes a las subunidades ribosomales, las cuales son altamente conservadas entre especies. (Liu M. y Hambleton S. 2010).

5.4. Variabilidad Intraespecífica y Composición Nucleotídica De *Puccinia Striformis*

La elección de la región más apropiada del material genético para realizar un análisis de variabilidad en un determinado nivel taxonómico, es una decisión crítica para obtener resultados informativos. En el presente estudio de variación intraespecíficas, los espaciadores internos (ITS) se muestran como la mejor opción, dado el nivel elevado de variación descrito para esta región en la literatura (Bruns TD *et al.*, 1991; Samuels GJ y Seifert KA, 1995). Sin embargo, el grado de variabilidad dentro de cada especie es distinto en función de las fuerzas evolutivas a las que se encuentre sometida y el tiempo transcurrido desde su divergencia a partir de su ancestro.

En la literatura se suelen encontrar muchos estudios en hongos del filo Ascomycota (*Fusarium spp.*) que dan como resultado un porcentaje alto de variabilidad intraespecífica dentro en esta región ITS (O'Donnell K, 1992; Yan ZH *et al.*, 1995; Pramateftaki *et al.*, 2000). En contraste para otras especies, de las familias *Sclerotiniaceae* o *Colletotridum* (ambas del Filo Ascomycota) el resultado es una variabilidad mínima (Carbone I y Kohn LM, 1993; Sreenivasaprasad *et al.*, 1993)

Normalmente, entre dos o más secuencias, la tasa de cambios del tipo transiciones (A↔G; C↔T) es mayor que la del tipo transversiones (A o G ↔ C o T). Sin embargo, a medida que aumenta la divergencia genética entre las

secuencias, el número de transiciones observadas con relación a las transversiones puede decrecer en función de la saturación. (Schneider H, 2007)

La variabilidad observada en la región ITS1-5.8S-ITS2 de las 84 muestras de *Puccinia striiformis*, se debe en su mayoría a mutaciones por transición de bases, probablemente derivadas de errores espontáneos no corregidos en el proceso de replicación. Entre los individuos no se encontraron situaciones donde las transversiones fueron mayores a las transiciones. Las transiciones son más comunes y pueden ocurrir por conversión química directa de una base por otra. (Lewin B, 2000), o por la presencia de formas tautoméricas de las bases que modifican el número de hidrógenos libres e inducen su apareamiento con bases incorrectas (Griffiths *et al.*, 2008).

Los fenómenos de transversion son menos frecuentes y sus mecanismos de mutación son más drásticos químicamente. Estas diferencias en la frecuencia de aparición en cada tipo de mutación entre secuencias homólogas, proporciona una fuente de información filogenética. Las transiciones, al ser fenómenos más comunes sugieren procesos evolutivos próximos, mientras que las transversiones son fenómenos más raros cuya presencia indica una mayor divergencia evolutiva. (Vinuesa MA, 2002)

5.5. Diversidad Genética, Historia Demográfica y Estructura Genética

El alineamiento contiene un total de 696 pares de bases de las cuales se han encontrado en total 9 sitios polimórficos (S) o variables (mutaciones). La mayoría de estos sitios variables se localizan en las regiones ITS1 e ITS2 (Figura 17). Se observa también la existencia de 6 diferentes haplotipos en diferentes

frecuencias (Tabla 10, Figuras 16 y 17) que nos estaría dando una evidencia de que existe una diversidad genética alta. De estos 6 diferentes haplotipos se mostró que 2 de ellos se encuentran fuertemente ligados a la zona más alejada hacia el norte de Ayacucho, mientras que los otros 4 haplotipos estuvieron concentrados en la zona del centro de la región. (Figura 14 y 15)

En términos de diversidad genética, las estimaciones efectuadas evidenciaron niveles altos de diversidad haplotípica ($HD = 0.68$), mientras que la diversidad nucleotídica, no fue tan alta ($\pi = 0.0032$) dentro de *Puccinia striiformis*. Por tratarse de un estudio pionero en esta especie (Ps), por el momento, no es posible realizar comparaciones, con otros estudios similares. Sin embargo, valores altos de diversidad genética (o moderados), han sido encontrados en diferentes investigaciones en el género *Puccinia spp.* (Bahri B. *et al.*, 2009; Duan X. *et al.*, 2010; Mboup M. *et al.*, 2009)

Para nuestro gen marcador (ITS) se observó que los haplotipos 1 y 6 fueron los más frecuentes en toda la población (Figura 17). Los mismo haplotipos que fueron observados ser los más frecuentes dentro de cada sub población Centro y Norte respectivamente. (Tabla 10 y Figura 16)

Estos resultados nos proporcionan información sobre la distribución de los 6 haplotipos encontrados por este estudio. Como se puede observar el Haplotipo 1 se encuentra mucho más frecuente en la Sub Población Centro, con 41 muestras. Mientras que para la Sub Población Norte, el Haplotipo 6 fue el más frecuente encontrado en las 21 muestras.

Nuestros resultados muestran una alta tasa de fijación de nuestro marcador en la población, dado por el índice de fijación ($F_{st}=0.8848$). Asimismo, se

evidencia una alta fijación de los haplotipos (1 y 6), debido principalmente a su frecuencia en las Sub Poblaciones correspondientes. Futuras investigaciones a nivel del genoma y no solo de un locus, serían necesarias para determinar y entender mejor si dicha fijación encontrada, pueda deberse al azar o una muy alta frecuencia de dichos haplotipos en la población fundadora, la cual pudo tener un tamaño efectivo reducido.

Estos estudios son una gran evidencia y prueba consistente que las poblaciones de royas (género *Puccinia spp.*), tienen un creciente incremento en su agresividad, ya que genotípicamente son tan variables, debido a su habilidad de causar enfermedades cada vez con mayor severidad y rápidamente sobre sus plantas hospederas. (Priestley RH. Doling DA. 1974)

Las estimaciones de la diversidad haplotípica y nucleotídica pueden proveer una primera aproximación sobre la historia de las poblaciones. Es así que, patrones caracterizados por una baja diversidad haplotípica (< 0.5) y nucleotídica ($< 0.5\%$) pueden ser explicados a través de eventos demográficos tales como la ocurrencia de un cuello de botella reciente o un efecto fundador (Grant WAS. Bowen BW, 1998)

En este contexto, los resultados obtenidos para *Puccinia striiformis* parecen ser bastante consistentes con un modelo de selección balanceadora. Si bien no se encontraron evidencia a favor de este modelo en las pruebas de neutralidad de tajima ($D_T = 0.578$) y F_u ($F_s = 2.28$) ya que hubo una carencia de resultados estadísticamente significativos. Los valores positivos de Tajima nos estarían dando una evidencia pequeña que nuestra población se encuentra en alguna forma de selección equilibradora, reducción poblacional, subdivisión

poblacional, cuello de botella reciente o migración (Schmidt D y Pool J, 2002). Es muy posible que los datos no hayan resultado estadísticamente significativos debido que en ciertos distritos las muestras no fueron representativas por tratarse de sólo 1 muestra colectada.

En cuanto a la posible influencia de fuerzas extrínsecas en el modelado de la distribución espacial de la variabilidad genética en *Puccinia striiformis*, nuestro estudio permitió evidenciar la posibilidad de que exista una barrera geográfica en la población. Cuando se realizaron los dendogramas en base a las distancias genéticas existentes entre las muestras (figura 14 y 15) las muestras fueron regionalizadas como sub poblaciones del norte y centro. Este proceso se realizó teniendo en cuenta que ambas subpoblaciones estuvieron divididas por una urbe, que en este caso es la Ciudad de Ayacucho.

La ciudad de Ayacucho que se encuentra dentro de los valles de los ríos Huatatas y Chacco. En este sentido, es muy probable que dicho valle está actuando como nuestra barrera geográfica de la población. Las muestras fueron colectadas de las provincias aledañas a la ciudad de Ayacucho que son sitios con una altitud mayor, entonces se puede inferir que nuestras 2 subpoblaciones estaría fuertemente separadas por este valle.

A partir del análisis de la distribución geográfica de los haplotipos y con respaldo en los valores de diferenciación obtenidos en el AMOVA ($F_{st} = 88.48\%$), se puede decir que la mayor diversidad genética de *Puccinia striiformis* se ajusta a un modelo de zonación longitudinal. Teniendo en cuenta como punto de partida a la ciudad de Ayacucho, tendríamos la zona norte y la zona centro (la

cual, si bien se encuentra al sur de la ciudad de Ayacucho, abarcaría también muestras cercanas hacia oeste y este de la ciudad)

Para nuestro material en estudio, se observó que la mayor diversidad genética se encuentra en la zona centro, que posee 4 de los 6 diferentes haplotipos encontrados en toda la población. Históricamente toda la zona centro ha sido siempre considerada como la de mayor índice de infección por Roya amarilla de cebada.

Finalmente cabe mencionar, que los resultados obtenidos representan una visión parcial de la situación que, en otros momentos, representaba el modelo de la diversidad existente de este patógeno en la naturaleza. Otro punto a mencionar es que el conocimiento de roya amarilla en el Perú es relativamente reciente debido a su introducción en Colombia, América del Sur y en Europa en 1975. (Brown *et al.*, 2001)

Por ser la primera aproximación de diversidad genética de este patógeno en el Perú, es importante continuar con investigaciones que apunten a trabajar mayor cantidad de genes evaluados por todo el genoma. También se debe considerar abarcar mayores lugares de muestreo para que el análisis de diversidad genética sea nacional.

5.6. Factores Que Influyen En La Diversidad Genética Detectada

La estructura genética se ve afectada por varios factores que establecen diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de una región a otra, entre los más comunes se encuentran los procesos genéticos como el flujo genético, la mutación, los modos de reproducción y la selección natural. Dado que nuestros

resultados son preliminares en *Puccinia striiformis*, no han mostrado ser estadísticamente significativos, esto debido a los motivos que ya se discutieron.

Sin embargo, al ser una aproximación a la diversidad genética en el Perú se puede sospechar la influencia de estos factores o procesos evolutivos que están gobernando la estructura poblacional de este patógeno.

La dinámica de frecuencias de genes y genotipos en una población local, está sujeto a fuerzas evolutivas tales como la selección, migración y deriva génica al azar en el caso de poblaciones con un tamaño pequeños de población efectiva. (Hovmöller MS *et al.* 2011)

Mutación:

Se propone a la mutación como el mecanismo de formación de nuevas razas en *Puccinia striiformis*. (Gassner G. y Straib W. 1993) La primera raza de roya amarilla fue encontrada en Australia en 1979 (Wellings CR. y McIntosh RA. 1990) Aproximadamente 20 años después una serie de nuevas razas habrían surgido, a menudo con genes de virulencia adicionales, pero con la diversidad molecular limitada. (Steele KA. *et al.*, 2001) Este hallazgo de hace 15 años atrás sería una evidencia fuerte de lo encontrado en nuestros resultados, ya que de igual forma se encontró una diversidad molecular limitada, visto en nuestros estimadores de diversidad. A su vez se ha encontrado estudios de poblaciones en Europa y Estados Unidos revelando nuevas razas que evolucionan constantemente con un aumento en la complejidad de la virulencia. (Bayles RA *et al.*, 2000; Chen X. y Penman L. 2005; de Vallavieille-Pope C. y Line RF. 1990; Enjalbert J. *et al.*, 2005; Justesen AF. *et al.*, 2002; Line RF. y Qayoum A. 1992).

Sin embargo, todos estos estudios fueron realizados en roya amarilla del trigo, así que con esta evidencia se espera un comportamiento similar en roya amarilla de cebada. La constante evolución que tienen los hongos para adquirir nueva virulencia, y su desarrollo de nuevas razas, podría explicar, en gran medida por qué la resistencia a razas específicas de Roya es frecuentemente comprometida dentro de pocos años luego de haber sido implantada en la agricultura. (Bayles RA *et al.*, 2000; Enjalbert J. *et al.*, 2005; Hovmøller MS. y Henriksen KE. 2008; Line RF 2002)

Recombinación:

Los recientes descubrimientos del hospedero alternativo de Roya amarilla del trigo, enfatizan el potencial rol de la recombinación sexual en generar diversidad en *Puccinia striiformis*. (Chen W. *et al.*, 20014)

Sin embargo, cabe resaltar que aún se desconoce el huésped alternativo de roya amarilla en cebada. Se podría especular la siguiente posibilidad: que el huésped alternativo es una variedad similar al encontrado (*Berberis spp.*) en roya amarilla del trigo. De cualquier manera, es necesario estudios que demuestran la naturaleza del ciclo de vida de la roya amarilla en cebada para entender mejor el rol de la recombinación en la diversidad genética.

Cuando se logre identificar el hospedero alternativo de Roya Amarilla de cebada, se podrá establecer bien el rol de este huésped en su función de generar diversidad a través de su fase sexual (por la recombinación). Este hallazgo también ayudará en conocer la dinámica epidemiológica de este patógeno ya que tendría evidencias del posible responsable de iniciar las epidemias. Tal como se

conoce en el caso de *Puccinia graminis*, que está ampliamente estudiado, donde dicho hospedero alternativo es el responsable de iniciar las epidemias por Roya del Tallo. (Burdon JJ. *et al.*, 1985; Roelfs AP. 1982)

Recientemente se ha descubierto una alta diversidad en poblaciones de *Puccinia striiformis* tanto en virulencia como con marcadores moleculares, en China (Duan X. *et al.*, 2010; Mboup M. *et al.*, 2009) y en Oriente Medio (Bahri B. *et al.*, 2009). Esto es consistente con la hipótesis de la existencia de la frecuente recombinación en estas áreas, a pesar que los mecanismos no están bien claro y establecidos. Sin embargo, observaciones en aislamientos de China que produjeron más rápidamente teliomorfos (fase sexual del hongo), que aislamientos de Europa, sugieren que la alta diversidad encontrada en China, es debido a la reproducción sexual. (Ali S. *et al.*, 2010)

De esta manera queda claro que la recombinación en *Puccinia striiformis* podría ser diferente entre regiones y depende mucho de la oportunidad de reproducción sexual que tenga. En el caso de *Puccinia striiformis*, es muy probable que la recombinación juegue un rol importante en la diversidad del patógeno, sin embargo, aún son necesario estudios que encuentren al huésped alternativo y otros estudios que demuestren la velocidad de formación de Telemorfos (fase sexual).

Migración, Deriva Génica y Selección:

Se han encontrado reportes que demuestran la espectacular propagación a largas distancias e incluso intercontinentales de *Puccinia striiformis*, adicionalmente la migración de urediniosporas aerotransportadas a pequeña escala, la interacción de

la deriva génica y la selección, también juegan un rol importante en la biología de los hongos. (Hovmøller MS. *et al.*, 2011)

La característica biotrófica del ciclo de vida de estos hongos, implican que la prevalencia de este patógeno esté cercanamente asociada con la distribución apropiada de su planta huésped. Por ejemplo, la ausencia del huésped alternativo y una desfavorable condición climática podría dar lugar a tamaños poblacionales bajos fuera de temporadas o inclusive llevar a la extinción local, lo cual podría resultar en una deriva genética. Eventualmente la población podría subsecuentemente llegar a restablecerse por migración de urediniosporas a partir de áreas cercanas vecinas.

Se han reportado recolonizaciones anuales de roya amarilla del trigo en Norte América y la India (Hamilton LM. y Stakman EC. 1967; Nagarajan S. y Singh DV. 1990) Generalmente siguieron un patrón predecible de royas desde sur hacia el norte, junto con el avance de los nuevos campos de cultivo de trigo y los vientos predominantes.

En otras áreas como Europa, donde la diversidad de cultivos hospederos podría ser mucho más extensa, el resultado de recolonización es menos predecible, por ejemplo, cuando nuevas razas virulentas son propagadas dentro de cultivares previamente resistentes. (Hovmøller MS. 2001; Hovmøller MS. y Henriksen KE. 2008; Justesen AF. *et al.*, 2002)

Es así que tanto la migración, en interacción con la deriva génica y la selección podrían estar también jugando un rol importante en la diversidad del patógeno. En el caso de nuestros resultados aún es muy prematuro enfatizar o inferir, si dichos procesos evolutivos gobiernan la diversidad ya que este trabajo

es preliminar y aún no se tiene conocimiento de la expansión total a nivel nacional que tiene la población global de este patógeno. Sin embargo, queda claro que muchos de estos procesos evolutivos están influenciando de alguna manera al comportamiento y la dinámica poblacional de la roya amarilla de cebada en el Perú. Y aún son necesarios muchos estudios complementarios no solo nacionales sino también a nivel de Sudamérica para contrastar los reportes que se tiene en otros continentes.

VI. CONCLUSIONES

- Se identificaron 2 diferentes clusters de *Puccinia striiformis* dentro de las 5 provincias de Ayacucho. El primer cluster, esta presente en la zona mas hacia el norte de la ciudad Ayacucho y comprende las provincias de Huanta y una pequeña zona de Huamanga (distrito de Quinua). El segundo cluster, esta presente en la zona centro a los alrededores de la ciudad de Ayacucho, comprendiendo las provincias de Cangallo, Huamanga, La Mar y Vilcashuaman.
- Se encontraron 6 diferentes haplotipos dentro de las 84 muestras de *Puccinia striiformis*. De los cuales 2 corresponden a la Sub-Poblacion Norte, mientras que los 4 restantes se encontraron en la Sub-Poblacion Centro.
- La Sub-Poblacion Centro mostro los índices mas altos de diversidad con respecto a la Sub-Poblacion Norte, y esto se contraste con la evidencia de haplotipos encontrados.
- Los resultados indican una fuerte estructura poblacional, lo cual demuestra que hay una baja tasa migración entre poblaciones y una fuerte deriva génica en cada Subpoblacion.

VII. RECOMENDACIONES

- Si bien nuestro método de aislamiento de urediniosporas resulto bastante efectivo para este estudio, se recomienda el uso de cultivos monopustulares, que son ampliamente usados para estudios de diversidad y/o caracterización molecular.
- Realizar una identificación de clusters en otras regiones del Perú, donde se sabe que haya una producción de cebada, que ayude a dar una mejor aproximación de la diversidad de este patógeno a nivel nacional.
- Se sugiere evaluar polimorfismo de secuencias a partir de otros genes, como los genes mitocondriales, factores de elongación, beta tubulina, external transcribed spacer (ETS), de manera que la estimación de la diversidad se vea reflejada por todo el genoma y no solo en un solo locus.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali S. Leconte M. Walker AS. Enjalbert J. de Vallavieille-Pope C. **Reduction in the sex ability of worldwide clonal populations of *Puccinia striiformis f. sp tritici***. Fungal Genet. Biol. 2010 (47): 828–38

Allison C, Isenbeck K. **Biological specialization of *Puccinia glummarum tritici* Eriksson and Henning**. Phytopathol. Z. 1930. (2): 87–98

Altschul SF. Gish W. Miller W. Myers EW. Lipman DJ. **Basic local alignment search tool**. Journal of Molecular Biology. 1990. (215): 403-410.

Anikster Y. **The formae speciales**. En The Cereal Rusts, Vol. 2, ed. AP Roelfs WR Bushnell. 1985. pp. 115–30. Orlando, FL: Acad. Press

Aradhya MK. Chan HM. Parfitt DE. **Genetic variability in the pistachio late blight fungus, *Alternaria alternata***. Mycological Research. 2001. (105): 300–306.

Arenal F. Platas G. Martin J. Salazar O. Pelaez F. **Evaluation of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for assessing the genetic variability of isolates of the fungus *Epicoccum nigrum***. Journal of Applied Microbiology. 2001. (87): 898–906.

Australian Government Office of the Gene Technology Regulator (AGOGTR).
The Biology of *Hordeum vulgare L.* (barley). 1st ed. Australia; 2008.

Avise JC. **Molecular markers, natural history and evolution.** 2nd Ed.
Sunderland: Sinauer Associates. 2004. p. 684.

Ayo MR. **Evaluación de la Resistencia de Roya Amarilla (*Puccinia striiformis f. sp. hordei*) y Roya de la Hoja (*Puccinia hordei*) en el Germoplasma Promisorio de Cebada (*Hordeum vulgare L.*) del INIAP de Dos Localidades.**
[Tesis de Grado]. Quito: Universidad Central de Ecuador; 2015.

Bahri B. Leconte M. Ouffroukh A. de Vallavieille-Pope C. Enjalbert J.
Geographic limits of a clonal population of wheat yellow rust in the Mediterranean region. Mol. Ecol. 2009. (18): 4165–79.

Barker GC. **Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002 Apr; 96 Suppl 1: S21-4.

Bayles RA. Flath K. Hovmøller MS. de Vallavieille-Pope C. **Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe.** Agronomie. 2000. (20): 805–11

Bell KC. Hafner DJ. Leitner P. Matocq MD. **Phylogeography of the ground squirrel subgenus *Xerospermophilus* and assembly of the Mojave Desert biota.** Journal of Biogeography. 2010. (37): 363-378.

Brown WM Jr. Hill JP. Velasco VR. **Barley yellow rust in North America.** Annu Rev Phytopathol. 2001; 39: 367-84.

Bruns TD. White TJ. Taylor JW. **Fungal molecular systematics.** Annual Review of Ecology and Systematics 1991. (22): 525-564

Burdon JJ. Roelfs AP. **The effect of sexual and asexual reproduction on the isozyme structure of populations of *Puccinia graminis*.** Phytopathology. 1985 (75): 1068-73.

Canal G. **Análisis de la variabilidad genotípica de cebada cervecera en rendimiento, porcentaje de proteína y calibre en distintos ambientes [Tesis].** Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2012.

Carbone I. Kohn LM. **Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the *Sclerotiniaceae*.** Mycologia. 1993. 85(3): 415-427.

Castro A. Capettini F. Información básica de la propuesta. **Identificación y utilización de resistencia durable a enfermedades de cebada en América**

Latina. URL disponible en:

http://www.fontagro.org/sites/default/files/prop_06_17.pdf.

Chen W. Wellings C. Chen X. Kang Z. Liu T. **Wheat stripe (yellow) rust caused by *Puccinia striiformis f. sp. tritici***. Mol Plant Pathol. 2014 Jun; 15(5): 433-46.

Chen X. Penman L. **Stripe rust epidemic and races of *Puccinia striiformis* in the United States in 2004**. Phytopathology. 2005. (95): S19

Duan X, Tellier A, Wan A, Leconte M, de Vallavieille-Pope C, Enjalbert J. ***Puccinia striiformis f. sp. tritici* presents high diversity and recombination in the over-summering zone of Gansu, China**. Mycologia. 2010. (102): 44–53

Dubin H. Stubbs R. **Epidemic Spread of Barley Rust in South America**. Plant Disease. 1986. (70): 141-144.

Enjalbert J. Duan X. Leconte M. Hovmoller MS. de Vallavieille-Pope C. **Genetic evidence of local adaptation of wheat yellow rust (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*) within France**. Mol. Ecol. 2005. (14): 2065–73.

Epperson BK. **Geographical genetics**. Princeton: Princeton University Press. 2003. p. 356.

Eriksson J. 1894. **About the specialization of parasitism in the cereal rust fungi.** Ber. Dtsch. Botanischen Gesellschaft. 1894. (12): 292–331

Excoffier L. Lischer HEL. **Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** Molecular Ecology Resources. 2010. (10): 564-567.

Excoffier L. Smouse PE. Quattro JM. **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data.** 1992. Genetics (131): 479-491.

Fernández M. **Introducción a la Fitopatología, Hongos y Micoplasmas.** INTA. Buenos aires, Argentina. 1979. pp. 80-108.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). [internet] [Actualizado 2013; citado el 10 Dic 2015] URL disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/S>

Flor HH. **The complementary genic systems in flax and flax rust.** En: Advances in Genetics, ed. M Demerec. New York: Acad. Press. 1956. (8):29–54

Fu YX. **Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection.** Genetics. 1997. (147): 915-925.

|

Gardes M. Bruns TD. **ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts.**

Molecular Ecology. 1993. (2): 113–118

Gassner G. Straib W. **Über mutationen in einer biologischen rasse von *Puccinia glumarum tritici* (Schmidt) Erikss. und Henn.** Mol. Gen. Genet. 1993.

(63):154–80

Gillespie JH. **The causes of molecular evolution.** New York: Oxford University Press. 1991. p. 336.

Golegaonkar PG. Wellings CR. Singh D. Park RF. **Genetic and molecular analyses of resistance to a variant of *Puccinia striiformis* in barley.** J Appl Genet. 2013 Feb; 54(1): 1-9.

González A. **Estudio de Caracteres Fenológicos, Agronómicos, Morfológicos y Fisiológicos en Relación con la Tolerancia al Estrés Hídrico en Cebada [Tesis Doctoral].** Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2001.

Grant WAS. Bowen BW. **Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lesson for conservation.** The Journal of Heredity. 1998 (89): 415-426.

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. **Introduction to genetic analysis**. W. H. Freeman and Company, New York. 2008.

Gutiérrez L, Germán S, Pereyra S, Hayes PM, Pérez CA, Capettini F, *et al.* **Multi-environment multi-QTL association mapping identifies disease resistance QTL in barley germplasm from Latin America**. Theor Appl Genet. 2015 Mar; 128(3): 501-16.

Hamilton LM, Stakman EC. **Time of stem rust appearance on wheat in western Mississippi basin in relation to development of epidemics from 1921 to 1962**. Phytopathology. 1967 (57): 609–14.

Hovmøller MS. 2001. **Disease severity and pathotype dynamics of *Puccinia striiformis f. sp tritici* in Denmark**. Plant Pathol. 2001. (50): 81–89.

Hovmøller MS, Henriksen KE. **Application of pathogen surveys, disease nurseries and varietal resistance characteristics in an IPM approach for the control of wheat yellow rust**. Eur. J. Plant Pathol. 2008. (121): 377–85.

Hovmøller MS, Sørensen CK, Walter S, Justesen AF. **Diversity of *Puccinia striiformis* on cereals and grasses**. Annu Rev Phytopathol. 2011; (49): 197-217.

Hungerford CW, Owens CE. **Specialized varieties of *Puccinia glumarum*, and hosts for variety *tritici***. J. Agric. Res. 1923. (25): 0363–402.

Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). [Internet]. Perú: Ministerio de Agricultura y Riego; [citado: 10 Dic 2013]. URL disponible en: <http://www.digesa.sld.pe/compial/compial.asp>

International Barley Genome Sequencing Consortium (IBGSC), Mayer KF, Waugh R, Brown JW, Schulman A, Langridge P, *et al.* **A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome.** Nature. 2012 Nov 29; 491(7426): 711-6.

Jacobsen J. Venables I. Wang MB. Matthews P. Ayliffe M. Gubler F. **Barley (*Hordeum vulgare L.*)** En: Wang K, editor. Agrobacterium Protocols. 2nd ed. New Jersey: Methods Mol Biol. 2006; p. 171-83.

Jin Y. Szabo LJ. Carson M. **Century-old mystery of *Puccinia striiformis* life history solved with the identification of Berberis as an alternate host.** Phytopathology. 2010. (100): 432-435.

Justesen AF. Ridout CJ. Hovmøller MS. **The recent history of *Puccinia striiformis f. sp. tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers.** Plant Pathol. 2002. (51): 13–23.

Keiper FJ. Hayden MJ. Park RF. Wellings CR. **Molecular genetic variability of Australian isolates of five cereal rust pathogens.** Mycol Res. 2003 May; 107(Pt 5): 545-56.

Kimura M. **Evolutionary rate at the molecular level.** Nature. 1968. (217): 624-626.

Kimura M. **The neutral theory of molecular evolution.** Cambridge: Cambridge University Press. 1983. p. 367.

Larkin MA. Blackshields G. Brown NP. Chenna R. McGettigan PA. McWilliam H. *et al.* **Clustal W and Clustal X version 2.0.** Bioinformatics. 2007. 23: 2947-2948.

Lewin B. **Genes VII.** 2000. Oxford University Press, Oxford.

Li YC. Korol AB. Fahima T. Beiles A. Nevo E. **Microsatellites: Genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review.** Mol. Ecol. 2002. (11): 2453-2465.

Librado P. Rozas J. **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** Bioinformatics. 2009. (25): 1451-1452.

Line RF. **Stripe rust of wheat and barley in North America: a retrospective historical review.** Annu. Rev. Phytopathol. 2002. (40): 75–118.

Line RF. Qayoum A. **Virulence, aggressiveness, evolution, and distribution of races of *Puccinia striiformis* (the cause of stripe rust of wheat) in North America, 1968–87.** USDA Technical Bulletin. 1992. 1788. 44 pp.

Liu M. Hambleton S. **Taxonomic study of stripe rust, *Puccinia striiformis sensu lato*, based on molecular and morphological evidence.** Fungal Biol. 2010. 114, 881-899.

Majer D. Mithen R. Lewis BG. Vos P. Oliver RP. **The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi.** Mycological Research. 1996. (100): 1107–1111.

Marshall D. Sutton RL. **Epidemiology of Stripe Rust, Virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. hordei and Yield loss in Barley.** Plant Disease. 1995. (79): 732-737.

Mboup M. Leconte M. Gautier A. Wan AM. Chen W. *et al.* **Evidence of genetic recombination in wheat yellow rust populations of a Chinese overwintering area.** Fungal Genet. Biol. 2009. (46): 299–307

McIntosh RA. Dubcovsky J. Rogers WJ. Morris C. Appels R. Xia XC. **Catalogue of gene symbols.** KOMUGI Integrated Wheat Science Database. [en línea]. 2010. URL disponible en:

<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp;jsessionid=689B192F53CED7CB561A9DC624FB9518.lb1,%202010>

McIntosh RA. Wellings CR. Park RF. **Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes**. East Melbourne, Australia: CSIRO Publ. 1995. 205 pp.

Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). **Cereales y Granos Andinos – Manual Técnico**. [en línea] 2011 [consultado en Nov 2015] URL disponible en: <http://agroaldia.minag.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/cereales-granos-andinos/manuallabranza.pdf>

Nagarajan S. Singh DV. Long-distance dispersion of rust pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1990. (28): 139–53.

Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations (population structure/genetic variability/heterozygosity/gene differentiation). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1973. (70): 3321-3323.

Nei M. **F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations**. *Annals of Human Genetics London*. 1977. (41): 225-233.

Nei M. Kumar S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press. 2000 p. 333.

Nei M. Li WH. **Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases.** Proceedings of the National Academy of Sciences 1979. (76): 5269-5273.

Nei M. **Molecular evolutionary genetics.** New York: Columbia University Press. 1987. p. 512.

Nei M. Suzuki Y. Nozawa M. **The neutral theory of molecular evolution in the genomic era.** Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2010. (11): 265-289.

Nielsen R. **Molecular signatures of natural selection.** Annual Review of Genetics. 2005. (39): 197-218.

Nilsson RH. Kristiansson E. Ryberg M. Hallenberg N. Larsson KH. **Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification.** Evol Bioinform Online. 2008 May 26; (4): 193-201.

O'Donnell K. **Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*).** Curr Genet. 1992 Sep; 22(3): 213-20.

Pastor S. **Manejo de la Biotecnología Apropriada para Pequeños Productores: Estudio de Caso – Peru.** [en línea] 2004. [citado en Ago 2015] URL disponible en: <http://www.bionica.info/biblioteca/Pastor2004BiotenologiaPeque%C3%B1os.pdf>

Peakall R. Smouse PE. **GenAlEx Tutorials - Part 2: Genetic distance and analysis of molecular variance (AMOVA).** 2009. [en línea]. Consultado el 10 de Sep. de 2012. URL disponible en: www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/new_version.php.

Perrier X. Flori A. Bonnot F. **Data analysis methods.** En: Hamon P. Seguin M. Perrier X. Glaszmann JC. Ed. Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier. 2003. pp 43 - 76.

Perrier X. Jacquemoud-Collet JP. (2006). **DARwin software.** URL disponible en: <http://darwin.cirad.fr/>

Pilkington MM. Wilder JA. Mendez FL. Cox MP. Woerner A. Angui T. Kingan S. Mobasher Z. Batini C. Destro-Bisol G. Soodyall H. Strassmann BI. Hammer MF. **Contrasting signatures of population growth for mitochondrial DNA and Y chromosomes among human populations in Africa.** Molecular Biology and Evolution. 2008. (25): 517-525.

Pool J. Aquadro CF. **History and structure of Sub-Saharan populations of *Drosophila melanogaster***. *Genetics*. 2006. (174): 915-929.

Pramateftaki PV. Antoniou PP. Typas MA. **The complete DNA sequence of the nuclear ribosomal RNA gene complex of *Verticillium dahliae*: intraspecific heterogeneity within the intergenic spacer region**. *Fungal Genet Biol*. 2000 Feb; 29(1):19-27.

Priestley RH. Doling DA. **Aggressiveness of *Puccinia striiformis* isolates on wheat cultivars**. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 1974. (63): 549–57

Ramírez-Soriano A. Ramos-Onsins SE. Rozas J. Calafell F. Navarro A. **Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination**. *Genetics*. 2008. (179): 555-567.

Rapilly F. **Yellow rust epidemiology**. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1979. (17): 59–73

Robredo A. **Mecanismos Fisiológicos de Respuesta de la Cebada al Impacto de la Sequía y el Elevado CO2** [Tesis Doctoral]. Leioa: Universidad del País Vasco; 2011.

Rodríguez D. **Estudio de la Variabilidad Fisiológica de la Roya Amarilla de la Cebada (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*) en 5 Provincias de la Sierra e**

Identificación de Posibles Fuentes de Resistencia en Germoplasma de Cebada del INIAP [Tesis de Grado]. Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; 2007.

Roelfs AP. **Effects of barberry eradication on stem rust in the United States.** Plant Dis. 1982. (66): 177–81.

Roelfs AP. Singh RP. Saari EE. **Las Royas del Trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades.** México D.F.: CIMMYT. 1992.

Sambrook J. Fritsch EF. Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York: 1989.

Samuels GJ. Seifert KA. **The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes.** Annu Rev Phytopathol. 1995; (33): 37-67.

Schmidt D. Pool J. **The effect of population history on the distribution of the Tajima's D statistic.** 2002. URL disponible en: <http://wolfweb.unr.edu/~drschmidt/TajimasD.pdf> [Consultado en Dic del 2015].

Schneider, H. **Métodos de Análisis Filogenéticos: Guía Práctica.** 3ra ed. Riberão Preto: Holos Editora & Sociedad Brasileira de Genética. 2007. pp. 200.

Schulte D, Close TJ, Graner A, Langridge P, Matsumoto T, Muehlbauer G, *et al.*
The international barley sequencing consortium--at the threshold of efficient access to the barley genome. Plant Physiol. 2009 Jan; 149(1): 142-7.

Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. Int J Parasitol. 1997. 27(10): 1135-1145.

Sreenivasaprasad S. Brown AE. Mills PR. **Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotrichum gloeosporoides*.** Mycological Research. 1993. (97): 995-1000.

Steele KA. Humphreys E. Wellings CR. Dickinson MJ. **Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f. *sp. tritici* by use of molecular markers.** Plant Pathol. 2001. (50): 174–80.

Tajima F. **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism.** Genetics 1989. (123): 585-595.

Tamura K. Stecher G. Peterson D. Filipski A. Kumar S. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** Mol Biol Evol. 2013 Dec; 30(12): 2725-9.

Tzeng TD. Yeh SY. Hui CF. **Population genetic structure of the kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) in East Asia inferred from mitochondrial DNA sequences.** ICES Journal of Marine Science. 2004. (61): 913-920.

de Vallavieille-Pope C. Line RF. 1990. **Virulence of North America and European races of *Puccinia striiformis* on North American, world, and European differential wheat cultivars.** Plant Dis. 1990. (74): 739-43

Villaseñor O. Huerta J. Leyva G. Villaseñor H. Singh R. Sandoval J. Espitia E. **Genética de la resistencia a roya amarilla en plantas adultas de trigo harinero.** Revista Mexicana de Fitopatología México. Fitotec: 2009. 32; p. 217-223.

Vinuesa MA. **Estudios Filogenéticos en la Familia Mycocaliciaceae (Mycocaliciales, Ascomycota).** [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2002.

Vivar H. McNab A. **Breeding Barley in the New Millenium. Proceedings of an International Symposium.** 82 p. México. CIMMYT; 2001.

Vogler RE. **Inferencia filogeografica aplicada a la conservación de hembras partenogénicas del género *Aylacostoma* Spix, 1827: especies amenazadas del río Paraná.** [Tesis Doctoral]. La Plata: Universidad Nacional de la Plata; 2013.

Von Bothmer R, Jacobsen N. **Origin, Taxonomy and related species.** En: Rasmusson D, editor. Barley. 1st ed. Madison: Agronomy Monograph. 1985; p. 19-53.

Wang MN. Chen XM. **First report of Oregon grape (*Mahonia aquifolium*) as an alternate host for the wheat stripe rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) under artificial inoculation.** Plant Dis., 2013. (97): 839.

Wang Y. Zhu M. Zhang R. Yang H. Wang Y. Sun G. Jin S. Hsiang T. **Whole genome amplification of the rust *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from single spores.** J Microbiol Methods. 2009 May; 77(2): 229-34.

Watterson GA. **On the number of segregating sites in genetical models without recombination.** Theoretical Population Biology 1975. (7): 256-276.

Weir BS. Cockerham CC. **Estimating F-statistics for the analysis of population structure.** Evolution. 1984. (38): 1358-1370.

Wellings CR. McIntosh RA. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Australasia—pathogenic changes during the first 10 years. Plant Pathol. 1990. (39): 316–25.

White TJ. Bruns TD. Lee SB. Taylor JW. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics.** En Innis MA. Gelfand DH.

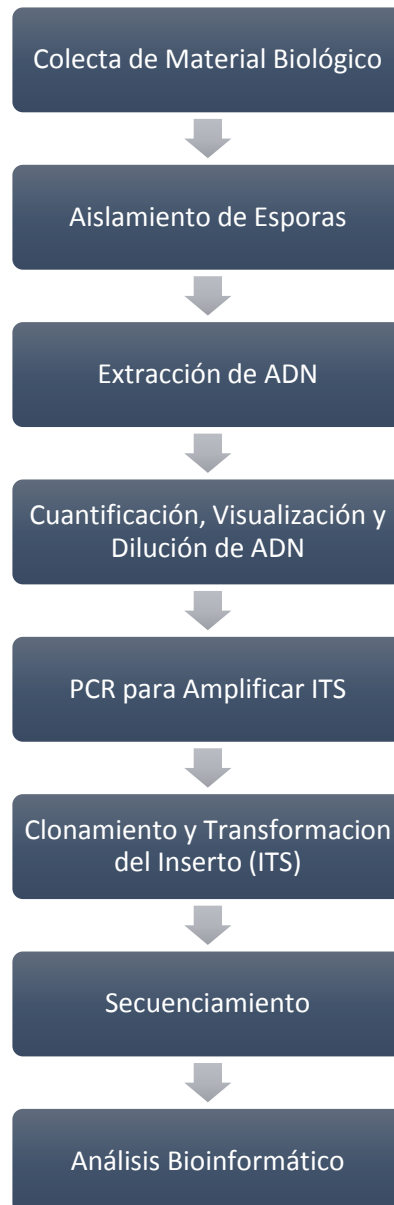
Snisky JJ. White TJ. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, USA: Academic Press. 1990. pp. 315-322.

Wright S. **The genetical structure of populations.** 1951. Annals of Eugenics (15): 323-354.

Yan ZH. Rogers SO. Wang CJK. **Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology.** Mycologia. 1995 (87): 72-83.

IX. ANEXOS

Anexo 01: Flujograma de Trabajo



Anexo 02: Ejemplo de Identificación por Alineamiento mediante BLAST:

Se realizó el alineamiento entre las secuencias forward y reverse para cada muestra con el fin de obtener una secuencia consenso (tener en cuenta que para el reverse, se utilizara el reverso complementario y alinearlo con el forward), se utilizara la muestra GRU001 como ejemplo.

Secuencia Consenso de la muestra GRU001:

>GRU001 (abarca ITS1 + 5.8S + ITS2)

TTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC
TGCGGAAGGATCATTATTAAGAAGACTAGAGTGCACTTTATTGTGGCT
CGACCCCTTTTAAAAATCTCACCCAACTTTTAAGACTTGGTTGCGTGA
TTTGAAAGAATCATTGCAATTGAGTAGACGTAACCTTCTTTATTGAATGT
TGCATTACCCTCCCTTTTTTTTTTTTTTTTATTAAAAATTACACAAAACAC
AAGTTTAAATGAATGTAACCAAACCTTTAATTATAAATAACTTTTAAC
AATGGATCTCTAGGCTCTCACATCGATGAAGAACACAGTGAAATGTGA
TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACG
CACCTTGCGCCTTTTGGTATTCCAAAAGGCACACCTGTTTGAGTGTCAT
GAAACCCTCTCATTAAATAATTTTGATTAATTATTTTCAATGGATGTTG
AGTGCTGCAGTAATTAGCTCACTTTAAATATATAAGTCACTTTTCTATA
AGTTGGATTGACTTGGTGTAATAATTTTATCATCACATCAAGGATTGTA
GCAATACTGCCATCTTATTTAAGGGAGACTCCCAAAAACCCAATTTTA
ACCTTAAGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATA
TCAATAAGCGGAGGAA

Ahora que se tiene la secuencia consenso de la muestra GRU001, se procede a realizar el análisis del BLAST con toda la base de datos del genbank para identificarla, para lo cual realizamos en alineamiento desde la página del ncbi:

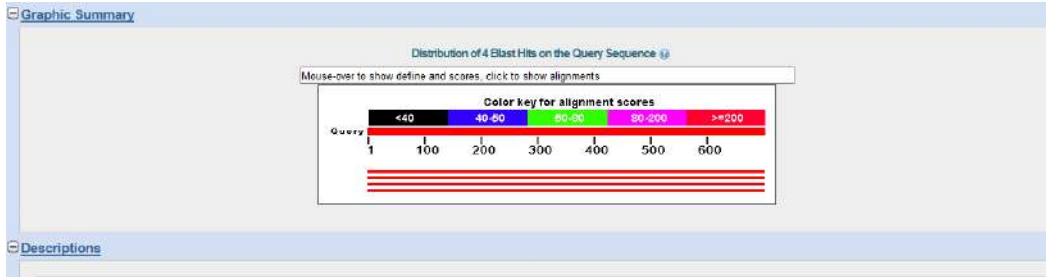
(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) Se utiliza los parámetros que se ven en la imagen y se realiza el análisis:

The image shows the NCBI BLAST search interface. The top section is titled "Enter Query Sequence" and contains a text area with a FASTA sequence: `ATCGAATCTTTGAAGCACCTTGGCCCTTTGGTATTCCAAAAGGCACACCTGTTTGAGTGT
CATGAAACCCCTCATTAAATAATTTGATTAATTATTTCAATGGATGTTGAGTGTGCAG
TAATTAGCTCACTTAAATATAAAGTCACTTTCTATAAGTTGGATTGACTTGGTGTAAATA
ATTTTATCATCACATCAAGGATTGTAGCAATACTGCCATCTTATTTAAGGGAGACTCCCAA
AACCCAAATTTAACCTTAAGACCTCAAAATCAGGTGGGACTACCGCTGAACCTTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGA`. Below the text area are fields for "Or, upload file" (with an "Examinar..." button), "Job Title" (with a descriptive title prompt), and a checkbox for "Align two or more sequences".

The middle section is titled "Choose Search Set" and includes options for "Database" (radio buttons for "Human genomic + transcript", "Mouse genomic + transcript", and "Others (nr etc.):" with a dropdown menu set to "Nucleotide collection (nr/nt)"), "Organism" (text field with "Puccinia striiformis f. sp. hordei (taxid:376348)" and an "Exclude" checkbox), "Exclude" (checkboxes for "Models (XM/XP)" and "Uncultured/environmental sample sequences"), "Limit to" (checkbox for "Sequences from type material"), and "Entrez Query" (text field with a "YouTube" icon and a "Create custom database" link).

The bottom section is titled "Program Selection" and has an "Optimize for" section with radio buttons for "Highly similar sequences (megablast)", "More dissimilar sequences (discontiguous megablast)", and "Somewhat similar sequences (blastn)", along with a "Choose a BLAST algorithm" link.

At the bottom, there is a large blue "BLAST" button and a checkbox for "Show results in a new window".



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Display list of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed	1258	1258	99%	0.0	99%	DQ417408.1
<input type="checkbox"/>	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei isolate HS20711 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrip	1258	1258	99%	0.0	99%	DQ409729.1
<input type="checkbox"/>	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei strain PSH14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed	1253	1253	99%	0.0	99%	DQ417322.1
<input type="checkbox"/>	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. hordei strain HS20711 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrip	1246	1246	99%	0.0	99%	DQ417402.1

Alignments

Download GenBank Graphics

Next Previous Descriptions

Puccinia striiformis f. sp. hordei strain PSH13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|DQ417408.1](#) Length: 1300 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 698 GenBank Graphics

Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Plus/Plus
1258 bits(681)	0.0	690/694(99%)	1/694(0%)		

```

Query 2   TCAITTAGAGGAAGTAAAAAGTCGTAACRAGGTTTCCTAGGTGACCTGCGGAAGGATCA 61
          |||
Sbjct 6   TCAITTAGAGGAAGTAAAAAGTCGTAACRAGGTTTCCTAGGTGACCTGCGGAAGGATCA 65
Query 62   TTATTAANAAGACTAGAGTGCACCTTATTTGGTGGCTCGACCCCTTTAAAAATCTCACCCA 121
          |||
Sbjct 66   TTATTAANAAGACTAGAGTGCACCTTATTTGGTGGCTCGACCCCTTTAAAAATCTCACCCA 125
Query 122  AACITTTAAGACTTGGTGGCTGATTTGAAGAATCATTCGAATTGAGTAGACGTAACCTT 181
          |||
Sbjct 126  AACITTTAAGACTTGGTGGCTGATTTGAAGAATCATTCGAATTGAGTAGACGTAACCTT 185
Query 182  CTTTATGAATGTGCAATACCCCTCCCTTTTAAATTTACACAAA 241
          |||
Sbjct 186  CTTTATGAATGTGCAATACCCCTCCCTTTTAAATTTACACAAA 244
Query 242  CACAAGTTAARATGAATGACCAACCTTTAATATAAATACCTTTAACAATGGATCT 301
          |||
Sbjct 245  CACAAGTTAARATGAATGACCAACCTTTAATATAAATACCTTTAACAATGGATCT 304
Query 302  CTAGGCTCCACACTCGATGAAGAACACAGTGAATGTGATAGTAATGTGAATGGAGAA 361
          |||
Sbjct 305  CTAGGCTCCACACTCGATGAAGAACACAGTGAATGTGATAGTAATGTGAATGGAGAA 364
Query 362  TTCAGTGAATCATGAACTTTTGAAGCACCCTTGGCCCTTTGGTATTCGAAAGGACCA 421
          |||
Sbjct 365  TTCAGTGAATCATGAACTTTTGAAGCACCCTTGGCCCTTTGGTATTCGAAAGGACCA 424
Query 422  CCTGTTGAGTGTCAATGAAACCTCTCATTAATAATTTGATTAATTTTCAATGG 481
          |||
Sbjct 425  CCTGTTGAGTGTCAATGAAACCTCTCATTAATAATTTGATTAATTTTCAATGG 484
Query 482  TGTGAGTGTGCAAGTAAATAGCTCATTAAATATAAGTCACTTTTCTATAAGTTGG 541
          |||
Sbjct 485  TGTGAGTGTGCAAGTAAATAGCTCATTAAATATAAGTCACTTTTCTATAAGTTGG 544
Query 542  ATTGACTTGGTGAATAATTTTATCATCATCAAGGATGTAGCAATAGTCCACTTTA 601
          |||
Sbjct 545  ATTGACTTGGTGAATAATTTTATCATCATCAAGGATGTAGCAATAGTCCACTTTA 604
Query 602  TTAAGGGAGACTCCCAAAAACCAATTTTAACTTAAAGCTCAATCAAGTGGGACTA 661
          |||
Sbjct 605  TTAAGGGAGACTCCCAAAAACCAATTTTAACTTAAAGCTCAATCAAGTGGGACTA 664
Query 662  CCGCTGAACCTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 695
          |||
Sbjct 665  CCGCTGAACCTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGA 698

```

Como se puede observar la muestra GRU001 alinea con un 99% de identidad y 99% de cobertura total con las únicas 4 secuencias anotadas en el genbank, correspondientes al gen de ITS del ADNr de roya de cebada (*Puccinia striiformis*).