

Diversidad Genética y Estructura Poblacional de *Boeremia noackiana*, Agente Causal de la
Mancha Anillada del Frijol

María Cristina Navas Serrano

Trabajo de Grado para Optar al Título de Bióloga

Directora

Viviana Ortiz Londoño

PhD. Plant Pathology and Ecology, Evolution and Behavior

Codirectora

Luz Nayibe Garzón Gutiérrez

PhD. Ciencias agrarias

Tutor

Fernando Rondón González

PhD. Ciencias-Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

A mis padres, María Cristina Serrano Reyes y Francisco Javier Navas Durán, por absolutamente todo, por sus esfuerzos y apoyo, porque en los días en que yo misma no era suficiente motivación para continuar, pensar en ustedes fue mi motivación para siempre seguir adelante. A mi hermana, Alejandra, por siempre acompañarme y por tomar el papel de hermana mayor mientras yo terminaba de estudiar. A mi gato, Valerio Antonio, porque es mi mejor amigo. Me estuvo acompañando a lo largo de esta carrera, nunca estuve sola, ni en los buenos días ni en los malos, siempre estuvo ahí. Los amo a todos, espero de ahora en adelante ser yo su fuente de apoyo.

Y a mí misma. Soy afortunada de escoger hacer lo que me hace feliz, a pesar de las dificultades que pueda enfrentar en el camino. Espero que la vida me siga llenando de caminos que me permitan ser feliz, crecer como persona y como profesional.

Agradecimientos

A mis mejores amigos, Sebastián y María Isabel, por apoyarme y estar presentes cuando las cosas no siempre iban bien y cuando las cosas iban muy bien, por recordarme que soy capaz cuando yo misma lo olvido, por estar siempre dispuestos a escucharme, por el apoyo, y por aportar siempre a mi felicidad, espero que compartamos momentos felices por muchos años más. Gracias a Erika, Ariadna, Luis, Arturo, Daniel, Camilo, Yessica, Juan, Narlen y Mateo, por crecer conmigo a lo largo de estos años, ojalá sigamos construyendo más recuerdos por muchos años más. Soy una persona afortunada de estar rodeada de personas que me aprecian y contribuyen a mi felicidad.

A mis directores, la doctora Luz Nayibe Garzón, la doctora Viviana Ortiz y al doctor Fernando Rondón por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, brindarme su amabilidad, por su disposición a enseñarme y por el apoyo brindado para hacer de mí una profesional competente. Al Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal y a sus integrantes, especialmente a John Sepúlveda, Yuranis Miranda y Erika Hernández por su colaboración y su aporte en el proyecto.

Al profesor Jorge Hernández, a la profesora Leidy Pico, y al CINBIN, porque a pesar de no estar involucrados en mi proyecto, estuvieron pendientes y siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y aconsejarme.

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y a los investigadores: Gloria Mosquera, Bodo Raatz, Daniel Ariza y Eliana González por proveer los datos y realizar los análisis que hicieron posible este trabajo.

Tabla de Contenido

	Pág.
INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo General.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 GENERALIDADES DEL FRIJOL (<i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	16
2.1.1 <i>Taxonomía y generalidades del frijol</i>	16
2.1.1 <i>El frijol en Colombia</i>	16
2.2 GENERALIDADES DE LA MANCHA ANILLADA	17
2.2.1 <i>Taxonomía y especies asociadas</i>	17
2.2.2 <i>Sintomatología y distribución</i>	18
2.2.3 <i>Tratamiento y control</i>	18
2.2.4 <i>La mancha anillada en Colombia</i>	19
2.3. DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	20
2.3.1 <i>Estudios de diversidad y estructura poblacional relacionados con la mancha anillada</i>	20
2.4. MARCADORES MOLECULARES	21
2.4.1 <i>Marcadores moleculares como herramientas para detectar la diversidad</i>	22
2.4.2 <i>Polimorfismos de único nucleótido (SNP's)</i>	22
2.4.2 <i>Estudios con marcadores moleculares tipo SNP's relacionados con la mancha anillada</i> .	23
3. METODOLOGÍA	24
3.1 LECTURA Y LLAMADO DE VARIANTES SNP'S	25

3.1.1 Lectura y llamado de variantes SNP's.....	25
3.1.2 Filtrado de las variantes SNP's.....	25
3.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	26
3.2.1 Diversidad y diferenciación genética	27
3.2.2 Diversidad genotípica por genotipos multilocus (MLG).....	27
3.2.3 Desequilibrio de ligamiento.....	28
3.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ESPACIAL.....	28
3.3.1 Reconstrucción filogenética de <i>máximum likelihood</i> (ML).....	28
3.3.2 Red de expansión mínima (MSN).....	29
3.3.3 Análisis de componentes principales (ACP).....	29
3.3.4 Análisis discriminante de componentes principales (DAPC).....	29
3.3.5 Estructura genética espacial.....	30
4. RESULTADOS	31
4.1 VARIANTES SNP'S EN FORMATO VCF	31
4.2 DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	31
4.2.1 Índices de diversidad y diferenciación genética.....	31
4.2.2 Diversidad genotípica por genotipos multilocus (MLG).....	32
4.2.3 Desequilibrio de ligamiento.....	33
4.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ESPACIAL.....	34
4.3.1 Relación evolutiva entre las muestras	34
4.3.2 Red de expansión mínima de genotipos	36
4.3.3 Análisis de componentes principales	37
4.3.4 Análisis discriminante de componentes principales (DAPC).....	37

4.3.5 Estructura genética espacial.....	41
5. DISCUSIÓN	42
5.1 ANÁLISIS DE LAS VARIANTES SNP'S.....	42
5.2 DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>Boeremia noackiana</i>	43
5.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL DE <i>Boeremia noackiana</i>	44
6. CONCLUSIONES.....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÉNDICES	63

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Distancia genética de Hamming y diversidad génica de <i>B. noackiana</i>	32
Tabla 2. Diferenciación genética de <i>B. noackiana</i> entre los departamentos	32
Tabla 3. MLG totales, únicos y compartidos de <i>B. noackiana</i> en los departamentos	33
Tabla 4. Índices de diversidad genotípicas y MLG de <i>B. noackiana</i> en los departamento	34

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Morfología, sintomatología y estructuras reproductivas de <i>Boeremia spp</i>	19
Figura 2. Departamentos de origen de los aislamientos de <i>B. noackiana</i>	24
Figura 3. Reconstrucción filogenética de ML de aislamientos de <i>B. noackiana</i>	34
Figura 4. Red de expansión mínima de genotipos de <i>B. noackiana</i>	36
Figura 5. Análisis de componentes principales de muestras de <i>B. noackiana</i>	37
Figura 6. Gráficos de dispersión del análisis discriminante de componentes principales	38
Figura 7. Probabilidad posterior de cada muestra de <i>B. noackiana</i> de pertenecer a los departamentos	39
Figura 8. Probabilidad posterior de cada muestra de <i>B. noackiana</i> de pertenecer a un grupo genético (K = 3)	40
Figura 9. Probabilidad de pertenencia de <i>B. noackiana</i> a las poblaciones ancestrales.....	41

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Aislamientos de <i>B. noackiana</i> utilizados en el llamado inicial de variantes SNP's.	63
Apéndice B. Calidad de genotipos versus frecuencia de variantes SNP	65
Apéndice C. Heterocigosidad en individuos y en variantes SNP	65
Apéndice D. Frecuencia de alelo menor versus frecuencia de variantes SNP.....	66
Apéndice E. Porcentaje de datos perdidos según el número mínimo de variantes genotipadas...	66
Apéndice F. Muestras emparentadas con <i>Boeremia exigua</i>	67
Apéndice G. Porcentaje de varianza explicado por los componente principal del ACP.	67
Apéndice H. Criterios del DAPC realizados con los departamentos seleccionados <i>a priori</i>	68
Apéndice I. Criterios del DAPC de agrupaciones genética	68
Apéndice J. Criterios del DAPC realizados con variedades de frijol seleccionadas <i>a priori</i>	69
Apéndice K. Variedades de frijol hospederas de las muestras de <i>Boeremia noackiana</i>	69
Apéndice L. Aislamientos de <i>B. noackiana</i> del VCF final y utilizados en los análisis.....	71
Apéndice M. Curva de rarefacción para análisis de genotipos multilocus de los departamentos	73
Apéndice N. Índice estandarizado de asociación de los departamentos.	73
Apéndice O. Valor de BIC versus número de agrupaciones genéticas escogidas	74
Apéndice P. Matriz de co-ascendencia de las muestras para k= 3 poblaciones ancestrales.....	74
Apéndice Q. DAPC realizado con variedades de frijol seleccionadas como grupos <i>a priori</i>	75

Glosario

Aislamiento: microorganismo separado de los demás microorganismos que lo acompañaban.

Desequilibrio de ligamiento: fenómeno producido entre alelos por su cercanía física en los cromosomas, se presentan juntos de manera frecuente en eventos de recombinación.

Enfermedad: estado de alteración fisiológico, metabólico o comportamental de la planta.

Genotipo: diferentes variantes alélicas presente en uno o más locus determinados.

Locus: ubicación física en el genoma, su plural es loci.

Patogenicidad: capacidad del patógeno para afectar y enfermar la planta.

Patógeno: organismo que genera y desarrolla las afectaciones propias de la enfermedad.

Rendimiento: medida de la cantidad de un cultivo cultivado, por unidad de superficie de tierra.

Resistencia: capacidad de la planta de superar completa o parcialmente las afectaciones generadas por el patógeno.

Susceptibilidad: capacidad inmunológica de un individuo frente a un determinado agente patógeno.

Variedad: subgrupo de individuos de una misma especie con características únicas

Resumen

Título: Diversidad genética y estructura poblacional de *Boeremia noackiana*, agente causal de la mancha anillada del frijol*

Autor: María Cristina Navas Serrano**

Palabras Clave: Mancha anillada, mancha de ascochyta estructura poblacional, diversidad genética, frijol, *Boeremia noackiana*, *Phaseolus vulgaris*

Descripción:

Phaseolus vulgaris L, conocido como frijol común, es una leguminosa de gran importancia en el mundo y en países tropicales por sus propiedades alimenticias y su facilidad de cultivo, sin embargo, su cultivo y producción pueden verse afectados por enfermedades causadas por fitopatógenos. Una de las enfermedades que afecta el rendimiento de los cultivos de frijol en Colombia es la mancha anillada, pese a esto, no se han realizado estudios de genéticos de los agentes causales. Con el objetivo de contribuir con el estudio de *Boeremia noackiana*, principal agente causal de la mancha anillada del frijol en Colombia, en el presente trabajo se estimó la diversidad genética y la estructura poblacional del patógeno, a partir de 13.105 marcadores tipo SNP's (polimorfismos de único nucleótido) presentes en 159 aislamientos obtenidos de muestras de frijol afectadas por la enfermedad en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander y Tolima. Los resultados obtenidos mostraron poca diversidad y diferenciación genética entre los departamentos, lo cual puede deberse a la ausencia o restricción de la recombinación genética del patógeno. Tampoco se evidenció estructura poblacional. Se estimaron tres agrupaciones genéticas, las principales compuestas por Antioquia y el grupo conformado por Boyacá, Huila y Tolima. Estos resultados apoyan la hipótesis de flujo genético entre los departamentos, por el transporte del patógeno mediado por el humano.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias Básicas. Escuela de Biología. Biología. Directora: Viviana Ortiz Londoño. PhD. Plant Pathology and Ecology, Evolution and Behavior. Codirectores: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez, PhD. Ciencias agrarias. Fernando Rondón González, PhD. Ciencias-Biología.

Abstract

Title: Genetic diversity and population structure of *Boeremia noackiana*, causal agent of the black node disease in common bean*

Author(s): María Cristina Navas Serrano**

Key Words: Black node disease, leaf spot, population structure, genetic diversity, common bean, *Boeremia noackiana*, *Phaseolus vulgaris*

Description:

Phaseolus vulgaris L, known as common bean, is an important legume for human consumption worldwide and in tropical countries due to its nutritional value and its ease of cultivation; however, its cultivation and production can be affected by diseases caused by phytopathogens. One of the diseases that affects bean production in Colombia is the black node disease, despite this, no genetic studies of the causative agents have been carried out. The objective of this study was to estimate the genetic diversity and population structure of the pathogen *Boeremia noackiana*, the primary pathogen of black node disease in Colombia. Here, we used 13.105 SNP markers (single-nucleotide polymorphisms), present in 159 isolates obtained from bean samples affected by the disease in the Colombian regions of Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander and Tolima. The results confirmed low genetic diversity and genetic differentiation by region, probably due to restricted genetic recombination. Moreover, there was no evidence of population structure. Three genetic clusters were identified, the main cluster grouped isolates from Antioquia, and two different clusters grouping isolates from Boyacá, Huila and Tolima. These results support the hypothesis of gene flow between regions, likely mediated by human transport of the pathogen.

* Degree Work

** Faculty of Basic Sciences. School of Biology. Biology. Director: Viviana Ortiz Londoño. PhD. Plant Pathology and Ecology, Evolution and Behavior. Codirectors: Luz Nayibe Garzón Gutiérrez, PhD. Ciencias agrarias. Fernando Rondón González, PhD. Ciencias-Biología

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) es un alimento de gran importancia en el mundo, siendo una de las leguminosas más consumidas y cultivadas debido a sus cualidades nutricionales (Broughton et al., 2003; Sirolli et al., 2015; Varón, 2016).

En Colombia, el frijol cuenta con una amplia diversidad, y es de importancia económica para el sector agrícola por su facilidad de cultivo en un amplio rango altitudinal y su precio accesible (Ospina-Parra et al., 2020; Salazar et al., 2018). Sin embargo, diversos factores tanto abióticos como bióticos pueden afectar su rendimiento, siendo las enfermedades causadas por patógenos fúngicos uno de los factores bióticos de mayor incidencia (Pastor-Corrales, 1985; Araya, 2003; Mkandawire et al., 2004).

Una de las enfermedades que afectan los cultivares de frijol en Colombia es la mancha anillada. Las plantas infectadas por el patógeno presentan manchas concéntricas de colores marrón a negro en las hojas y vainas, y es transmitida por medio de las semillas de las plantas infectadas (Schwartz et al., 1981). Los registros de la enfermedad determinan que los causales son las especies de hongos *Boeremia diversispora* (Bubák), *B. exigua* (Desm), *B. noackiana* (Allesch) y *Stagonosporopsis hortensis* (Sacc. y Malbr) (Aveskamp et al., 2010; Boerema et al., 1981; Ferreira et al., 2016; Pastor-Corrales y Schwartz, 1994; Schmit y Baudoin, 1992).

La mancha anillada ha llegado a ser una de las enfermedades del frijol de mayor relevancia en el país, debido a su amplia distribución en departamentos productores como Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Nariño, Santander, Tolima y el Valle del Cauca (CIAT, 1983; Miranda, 2018), llegando a ocasionar pérdidas de rendimiento hasta en un 40% en los cultivares afectados (CIAT, 1983; Schwartz et al., 1981). Pese a esto, el patógeno no se ha estudiado a fondo, ni se han implementado estrategias de manejo eficientes para la enfermedad.

Un único estudio previo sobre la diversidad genética de la mancha anillada realizado por Blair et al. (2011), sugirió una posible variación del patógeno en los departamentos de Antioquia, Cauca, Cundinamarca y Santander, cuando se evaluó la resistencia y susceptibilidad de distintas variedades de frijol inoculadas con aislamientos de dichas regiones, y se obtuvo una respuesta diferencial. Sin embargo, en el estudio no se realizaron pruebas a nivel molecular, ni se profundizó en el análisis de diversidad o estructura genética.

Los análisis de diversidad genética y estructura poblacional de fitopatógenos como el agente causal de la mancha anillada aportan bases para el conocimiento de la enfermedad, desarrollo de programas de mejoramiento, mejor manejo de las estrategias de control de la enfermedad (Müller et al., 2015; Farahani et al., 2019).

Debido a la importancia del patógeno y a las pérdidas económicas que genera actualmente en Colombia, es necesario ampliar los estudios sobre el agente causal de la mancha anillada, que permitan generar información base, para en el futuro desarrollar e implementar técnicas eficientes de manejo de la enfermedad, como por ejemplo, la obtención de variedades de frijol con resistencia genética.

Con el objetivo de contribuir con el estudio de *Boeremia noackiana*, principal agente causal de la mancha anillada del frijol en Colombia, en el presente trabajo se evaluó su diversidad genética y estructura poblacional mediante el análisis de marcadores tipo SNP's (polimorfismos de único nucleótido), pertenecientes a 159 aislados del patógeno, obtenidos de muestras de frijol infectadas provenientes de los departamentos productores de Antioquía, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander y Tolima.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Contribuir con el estudio de *Boeremia noackiana*, mediante el análisis de la diversidad y estructura genética de muestras obtenidas en departamentos productores de frijol de Colombia.

2.2 Objetivos Específicos

Estimar la diversidad y diferenciación genética de *Boeremia noackiana* en aislamientos obtenidos de plantas presentes en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander, Tolima y Valle del Cauca, a partir de SNP's.

Analizar la estructura poblacional y espacial de *Boeremia noackiana* en aislamientos obtenidos de plantas presentes en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander, Valle del Cauca y Tolima a partir de SNP's y datos geográficos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DEL FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L)

2.1.1 Taxonomía y generalidades del frijol

Phaseolus vulgaris L, conocido como frijol común, es una planta Eudicotiledonea de la familia Fabaceae (sin: Leguminoseae) (The Angiosperm Phylogeny Group, 2016). Es considerada una de las especies de leguminosas más producidas y consumidas del mundo, llegando a ser cultivado en 129 países, y un ingrediente primario en la dieta de la mayoría de los países de África y América, donde también contribuye en la economía de los sectores rurales (Cavalcante et al., 2020; Sirolli et al., 2015; Urbina, 2018). Su importancia radica en sus cualidades nutricionales, ya que es rico en proteínas, carbohidratos complejos, vitaminas, minerales y fibra, además de reducir el riesgo de diversas enfermedades como la diabetes o padecimientos cardiovasculares (Ulloa et al., 2011; Khanal et al., 2014; Varón, 2016).

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), se estima que en 2019 fueron producidas 25.686.248 toneladas de frijol alrededor del mundo, de las cuales el 45% en producido por Latinoamérica, región de mayor consumo y producción (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997; Varón, 2016).

2.1.1 El frijol en Colombia

En Colombia, el frijol se cultiva principalmente en los departamentos de Antioquia, Cundinamarca, Huila, Nariño, Santander y Tolima (FENALCE, 2022). Generalmente, el frijol cultivado se cataloga en dos clases de acuerdo con su morfología: el arbustivo, de bajo crecimiento con una altura máxima de 70 cm; y el voluble, de crecimiento ramificado, de preferencia comercial

debido a su tamaño de grano. Ambas clases se adaptan tanto a zonas montañosas como a planas, crecen en alturas entre 800 y 2700 m.s.n.m, y temperaturas entre 15°C y 27°C (CIAT, 1982; Arcos y Rojas, 2019).

En el país, el frijol es de gran importancia tanto económica como cultural, por su influencia en el sector agrícola (Arcos y Rojas, 2019; Ospina-Parra et al., 2020). Durante el 2021, fueron producidas alrededor de 104.905 toneladas de frijol en un área de 83.527 hectáreas, no obstante, también fueron importadas 22.762 toneladas originarias en su mayoría de Ecuador, Argentina, Bolivia y Estados Unidos (FENALCE, 2022). A pesar de la alta producción interna, esta no es suficiente para suplir la demanda del país, ni para generar excedentes que permitan la exportación (Amado et al., 2014; Petro, 2021).

La oferta del frijol puede verse influenciada por las pérdidas de rendimiento ocasionadas por diversos factores bióticos y abióticos que afecten su rendimiento, siendo las enfermedades causadas por patógenos fúngicos uno de los factores bióticos de mayor incidencia (Araya, 2003; Mkandawire et al., 2004; Pastor-Corrales, 1985).

2.2 GENERALIDADES DE LA MANCHA ANILLADA

2.2.1 Taxonomía y especies asociadas

La mancha anillada del frijol, también conocida en diversas regiones como “la gota” (Y. Miranda, 2018; Sepúlveda, 2018), ascoquita (Peralta et al., 2016), *ascochyta blight* (Ferreira et al., 2016), *black node disease* (Boerema et al., 1981), es una fitopatología fúngica emergente, cuyos agentes causales registrados son hongos del filo Ascomycota, de la familia Didymellaceae, de especie *Boeremia diversispora* (Bubák) (sinónimo: *Phoma diversispora*, *P. exigua* var. *diversispora*), *B. exigua* (Desm) (Sinónimo: *Ascochyta phaseolorum* y *P. exigua* var. *exigua*), *B.*

noackiana (Allesch) y *Stagonosporopsis hortensis* (Sacc. y Malbr) (Aveskamp et al., 2010; Pastor-Corrales y Schwartz, 1994; Schmit y Baudoin, 1992).

2.2.2 Sintomatología y distribución

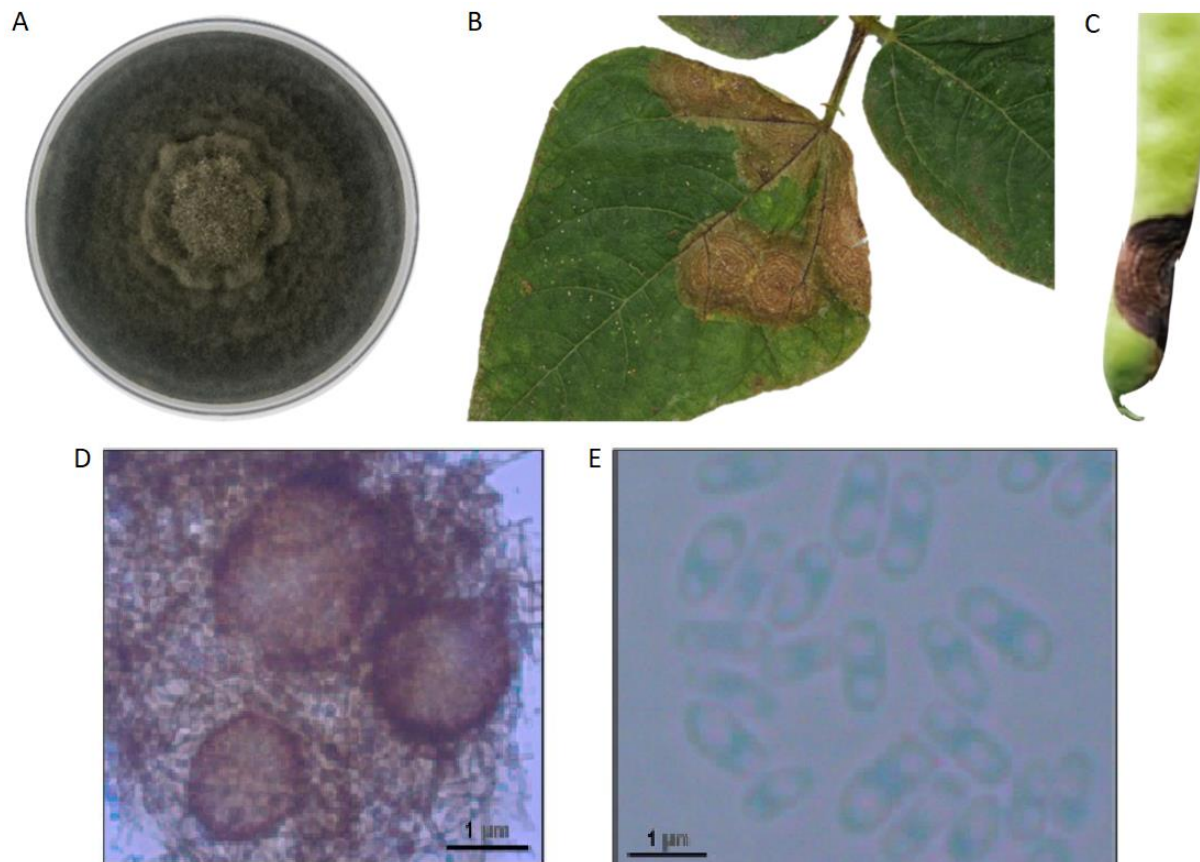
Los síntomas de la enfermedad comienzan por la aparición de manchas necróticas de color marrón a negro en las hojas y vainas de la planta, que aumentan de tamaño y forman anillos concéntricos, que puede llegar al pedúnculo, el peciolo y el tallo (Boerema et al., 1981; Schwartz et al., 1981; Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987) (Figura 1). Se transmite a través de las semillas y residuos de las plantas infectadas, y por medio de esporas asexuales llamadas conidios, producidas en estructuras reproductivas características del patógeno llamadas picnidios (Figura 2) (Boerema et al., 1981; Schwartz et al., 1981; Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987). La enfermedad se distribuye a alturas sobre los 1.200 m.s.n.m, a temperaturas entre 12°C y 20°C, por lo cual se ve favorecida en zonas templadas, con alta humedad relativa, y en temporadas de lluvias (Schwartz et al., 1982; Lepoivre y Baudouin, 1993; Ferreira et al., 2016).

2.2.3 Tratamiento y control

Para el control del patógeno se recomienda la alternancia con otros cultivos, siembras de semillas no infectadas, tratamiento químico de las semillas infectadas, destrucción de cosechas enfermas, el uso de fungicidas foliares con base en azufre, fentin hidróxido de estaño y propineb, y el uso de cultivares resistentes (Arias-Restrepo et al., 2007; Pastor-Corrales y Schwartz, 1994). Actualmente no hay variedades de frijol comerciales con resistencia a la enfermedad, sin embargo, se ha estudiado la resistencia genética de las especies *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus dumosus* (Arias-Restrepo et al., 2007; Blair et al., 2011).

Figura 1.

Morfología, sintomatología y estructuras reproductivas de Boeremia spp



Nota. (A) Aislamiento de *Boeremia spp.* (B) Síntomas de la mancha anillada en hojas de frijol. (C) Síntomas de la mancha anillada en vaina de frijol. Tomado de Miranda (2018). (D) Picnidios de *Boeremia spp.* (E) Conidios de *Boeremia spp.* Tomado de Miranda y Garzón (2021).

2.2.4 La mancha anillada en Colombia

La enfermedad cuenta con una amplia distribución dentro de Colombia, ya que se encuentra presente en los principales departamentos productores de frijol (Blair et al., 2011; Garzón et al., 2011; Miranda, 2018). De igual manera, presenta altas tasas de severidad, causando pérdidas en producción de hasta el 40% por cultivar, por lo cual se considera una enfermedad de alta relevancia

(Schwartz et al., 1981; Tamayo, 1995; Arias-Restrepo et al., 2007). En Colombia se han realizado estudios de identificación, distribución, y severidad de los agentes causales, sin embargo, no se han realizado estudios sobre su diversidad genética y estructura poblacional.

2.3. DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL

La diversidad genética se define como el conjunto de variaciones genéticas, es decir, las diferentes variantes alélicas presentes en el ADN, que se encuentran en diferentes frecuencias entre los individuos de una población y entre poblaciones (Klug et al., 2006; Ellegren y Galtier, 2016). Estas variaciones denominadas polimorfismos, permiten a las poblaciones responder y adaptarse a los cambios ambientales, por lo tanto, se consideran la base de los cambios evolutivos, y su estudio tiene implicaciones en ramas de la genética, la agricultura, la medicina, entre otras (Kimura, 1983; Nevo, 2001; Ellegren y Galtier, 2016).

La cantidad de diversidad y la forma como se distribuyen las variaciones genéticas dentro y entre las poblaciones se conoce como estructura genética (Pastorino y Marchelli, 2021). La estructura es determinada por factores ecológicos y genéticos que afectan el número de subpoblaciones dentro de una población, la frecuencia de las variantes alélicas y el grado de aislamiento de cada subpoblación (Slatkin, 2017; Pastorino y Marchelli, 2021). Los factores que afectan la variación son las mutaciones, la deriva genética, la selección natural y el flujo genético, siendo este el componente más importante para determinar si las subpoblaciones se estructuran como unidades evolutivas independientes (Chakraborty, 1993; Slatkin, 2017).

2.3.1 Estudios de diversidad y estructura poblacional relacionados con la mancha anillada

En un único estudio previo sobre la diversidad genética de los agentes causales de la enfermedad, distintas variedades de frijol fueron inoculadas con aislamientos del patógeno

pertenecientes a los departamentos de Antioquia, Cauca, Cundinamarca y Santander, obteniendo una respuesta de resistencia y susceptibilidad diferencial con respecto a las regiones, siendo la cepa de Cundinamarca la más patogénica, y la de Santander la menos patogénica (Blair et al., 2011; Garzón et al., 2011).

Los fitopatógenos poseen mecanismos de variabilidad genética como lo son la mutación, el flujo génico y la recombinación, que les permiten una adaptación rápida a las diversas condiciones ecológicas en las que se desarrollan los cultivos (Burdon y Silk, 1997; Araya, 2003; Milgroom, 2017). Esta interacción genera sistemas genéticos complementarios entre los fitopatógenos, que expresan genes de virulencia, y las plantas, que expresan genes de resistencia (McDonald y Linde, 2002; Bever et al., 2015; Burbano-Figueroa, 2020). Sin embargo, cuando se dan condiciones que modifican la estructura poblacional del patógeno y diferencian sus poblaciones, se puede llegar al desarrollo de nuevas variantes, a las cuales las plantas pueden ser más susceptibles (Araya, 2003; Bever et al., 2015; McDonald y Linde, 2002). Por ejemplo, mutaciones pueden dar origen a patógenos más virulentos, o con nuevas características que pueden ser favorecidas por selección (Burbano-Figueroa, 2020).

Debido a esto, los análisis de diversidad genética de fitopatógenos son de relevancia, ya que proporcionan información base que permite la identificación de nuevas variantes de los patógenos y el desarrollo de individuos con resistencia genética a las enfermedades (Müller et al., 2015).

2.4. MARCADORES MOLECULARES

En genética, se definen como secuencias de ADN que evidencian polimorfismos, y son detectables en el genoma de un organismo mediante el uso de técnicas moleculares (Nevo, 2001;

Rentería, 2007; Ríos et al., 2009). Los marcadores de ADN, debido a su facilidad de uso, estabilidad, especificidad y alcance, permiten una evaluación más precisa y completa de la diversidad genética de distintos loci, de acuerdo con el grupo de individuos que se desee estudiar (Ríos et al., 2009; Rocha, 2003).

2.4.1 Marcadores moleculares como herramientas para detectar la diversidad

Los marcadores moleculares, al ser herramientas que permiten detectar cambios a nivel fenotípico, secuencias de ADN o ARN sin caracterizar, cambios pequeños en los genomas, o genotipos que no pueden detectarse mediante el fenotipo, son de gran utilidad para los análisis de diversidad genética en el estudio de la genética poblacional (Milgroom, 2017). Los marcadores moleculares más eficientes para realizar análisis poblacionales son los que se caracterizan por su neutralidad, especificidad, capacidad para detectar polimorfismos, baja probabilidad de homoplasia, y codominancia; además de ser eficientes y replicables en cuestiones de implementación, y de costos accesibles (Milgroom, 2017).

2.4.2 Polimorfismos de único nucleótido (SNP's)

Los polimorfismos de único nucleótido (*single nucleotide polymorphism*), conocidos como SNP, son marcadores moleculares que muestran todos los posibles cambios en el genoma a nivel nucleotídico: sustituciones de un nucleótido, inserciones, deleciones y variación del número de nucleótidos en motivos repetidos (Nevo, 2001; Ríos et al., 2009). Los marcadores de tipo SNP's permiten el análisis eficiente de la diversidad y variabilidad genética, debido a su alta especificidad, codominancia, y baja tasa de error; además de su alto rendimiento y a los desarrollos tecnológicos actuales en secuenciación de nueva generación, los cuales permiten la realización de metodologías asequibles (Milgroom, 2017).

2.4.2 Estudios con marcadores moleculares tipo SNP's relacionados con la mancha anillada

En estudios anteriores, se ha analizado la resistencia genética a agentes causales de mancha anillada en distintas especies de leguminosas de importancia comercial como el garbanzo (Deokar et al., 2019), el guisante (Jha et al., 2015) y el haba (Kaur et al., 2014; Faridi et al., 2021) mediante el uso de marcadores tipo SNP. En otros estudios realizados con *Boeremia exigua*, *B. diversispora*, *B. noackiana*, *Stragonosporopsis hortensis* y especies cercanas se utilizaron diversos marcadores moleculares para análisis taxonómicos, de diferenciación y caracterización (Abeln et al., 2002; Aveskamp et al., 2009, 2010; Ferreira et al., 2016; Sepúlveda, 2018), sin embargo, no se han realizado estudios de la diversidad genética de *B. noackiana* utilizando marcadores moleculares de tipo SNP's.

Debido a lo mencionado en la introducción, a la importancia de la enfermedad de la mancha anillada y a las pérdidas económicas que genera en el sector agrícola en Colombia, es necesario ampliar los estudios de diversidad genética y estructura poblacional de los agentes causales, que permitan generar información base para el desarrollo e implementación de estrategias eficientes de diagnóstico, monitoreo y manejo de la enfermedad, y la obtención de variedades de frijol con resistencia genética. Por lo tanto, y con el objetivo de contribuir con el estudio de *Boeremia noackiana*, en el presente estudio se evaluó su diversidad genética y la estructura poblacional a partir del análisis de marcadores tipo SNP's resultantes de un proceso de genotipado por secuenciación (GBS), obtenidos de aislamientos del patógeno de plantas de frijol común infectadas, procedentes de los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander, Tolima y Valle del Cauca.

3. METODOLOGÍA

Para los análisis, se utilizaron inicialmente 225 secuencias Illumina HiSeq2500 de *Boeremia noackiana* en tres librerías GBS tipo *single-end* (Apéndice A). Para la obtención de las secuencias, el Laboratorio de Fitopatología de Frijol de la Universidad Nacional de Colombia, realizó la extracción de ADN de aislamientos del patógeno, pertenecientes a la colección del agente causal de la mancha anillada del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), obtenidos de plantas de frijol común infectadas, de los departamentos de Antioquia (N=50), Boyacá (N=13), Cauca (N=11), Cundinamarca (N=47), Huila (N=42), Santander (N=4), Tolima (N=41) y Valle del Cauca (N=13) en Colombia entre los años 2009 y 2017 (Figura 2) (Tabla 1). Con los extractos de ADN, se realizó la preparación de las librerías mediante un protocolo de GBS usando la enzima de restricción *ApeKI*, efectuado por el Laboratorio de Mejoramiento de Frijol Andino del CIAT.

Figura 2.

Departamentos de origen de los aislamientos de B. noackiana



3.1 LECTURA Y LLAMADO DE VARIANTES SNP'S

3.1.1 Lectura y llamado de variantes SNP's

Inicialmente, se evaluó la calidad de las secuencias de GBS mediante FastQC (Andrews, 2010). Posteriormente, se realizó la remoción de los adaptadores utilizados para la secuenciación con Illumina mediante el software Cutadapt v 1.16 (Martin, 2011). Las secuencias resultantes fueron leídas, y mapeadas contra el genoma de referencia, *Boeremia exigua* MPI-SDFR-AT-0100, y posteriormente se realizó el llamado de las variantes SNP'S en formato VCF (variante call format) usando el programa NGSEP (Next Generation Sequencing Experience Platform) (Tello et al., 2023).

3.1.2 Filtrado de las variantes SNP's

Para el filtrado de la matriz genotípica resultante, Inicialmente se asignó un valor mínimo de calidad genotípica (GQ) de 20 (Apéndice B), para eliminar SNP's soportados por una única lectura y para eliminar errores de secuenciación. Debido a que no se ha reportado reproducción sexual para *B. noackiana* (Miranda y Garzón, 2021), no se espera un alto valor de heterocigosidad en los marcadores, por lo tanto, se eliminaron los aislados con valores de heterocigosidad mayor a 0.05 (Apéndice C). Se removieron los SNP's con una frecuencia del alelo menor (MAF) por debajo de 0.02 (Apéndice D), para eliminar los marcadores con alelos poco frecuentes, o errores en la secuenciación. Finalmente, para eliminar al menos el 80% de los datos perdidos de la matriz genotípica, se eliminaron las muestras que contaban con menos de 1.000 llamados de SNP's, y se eliminaron SNP's genotipados en menos de 140 aislados (Apéndice E). Estos filtros fueron realizados mediante el programa NGSEP v4.3.1 (Tello et al., 2023).

Seguido a esto se realizó un segundo filtrado para la eliminación de muestras que pudiesen pertenecer al genoma de referencia, *B. exigua*. Para ello, se utilizó el objeto VCF con las variantes

SNP's resultantes de los anteriores filtrados para crear un alineamiento múltiple de los aislamientos, por medio del programa TASSEL v5.2.87 (Bradbury et al., 2007). Posteriormente, se realizó una búsqueda y evaluación de la topología bajo el criterio de maximum likelihood (ML) con el criterio de convergencia automática de bootstrapping. Se utilizó GTR (General-Time-Reversible) (Tavare, 1986) como modelo de sustitución, y la distribución GAMMA y proporción de sitios invariantes como modelos de tasa de heterogeneidad mediante RA-ML-NG v1.1.0 (Stamatakis, 2014). La topología resultante fue graficada mediante el paquete *ggtree* v3.2.1 de R (Yu et al., 2017; R Core Team, 2022). Para confirmar las relaciones observadas en la filogenia de ML, y estimar las distancias genéticas entre las muestras con el outgroup, se utilizó el alineamiento para realizar una MSN (red de expansión mínima) basada en la distancia de Hamming mediante el programa SplitsTree v4.18.3 (Huson y Bryant, 2006) (Apéndice F). De acuerdo con los resultados obtenidos, se removieron las muestras con mayor cercanía a *B. exigua*. Finalizando, también fueron removidas las muestras que no contenían información geográfica.

3.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Todos los análisis fueron realizados con las variantes SNP de los aislados en formato genind mediante el paquete *vcfR* v1.12.0 de R (Knaus y Grünwald, 2016, 2017), junto con los datos geográficos de cada aislamiento definidos *a priori* como strata. El conjunto de datos fue tratado bajo una corrección clonal, donde se eliminaron las muestras que, a pesar de ser de diferentes aislamientos, son genéticamente iguales y pueden corresponder a clones. Esta corrección evita sesgos en los análisis realizados (Smith et al., 1993).

3.2.1 Diversidad y diferenciación genética

Todos los análisis fueron realizados en R (R Core Team, 2022). Inicialmente se realizó la estimación de diversidad génica (H_{exp}), para medir la homogeneidad de las frecuencias alélicas en los loci (Nei, 1978), usando el paquete *adegenet* v2.1.7 (Jombart, 2008; Jombart y Ahmed, 2011). Para cuantificar la cantidad de cambio entre en las secuencias de los aislamientos, se estimó la distancia genética de Hamming ($h_distance$), pareada entre los departamentos (van Lint, 1998) con el paquete *poppr* v2.9.3 (Kamvar et al., 2014, 2015). La diferenciación genética entre los departamentos se estimó mediante el índice de diferenciación genética de Nei (G_{st}) (Nei, 1978), por medio del paquete *mmod* v1.1.3 (Winter, 2012).

3.2.2 Diversidad genotípica por genotipos multilocus (MLG)

Todos los análisis fueron realizados en R (R Core Team, 2022). La diversidad genética y el grado de recombinación de *B. noackiana* entre los departamentos se determinó mediante la estimación de genotipos multilocus (MLG), es decir, las combinaciones únicas de alelos en dos o más loci. Para mejorar la identificación de genotipos únicos, se estimó un límite de distancia genética de 0,009 basada en la distancia de Hamming, equivalente a 9 SNP's (Arnaud-Haond et al., 2007), con el paquete *poppr* v2.9.3 de R (Kamvar et al., 2014; Kamvar, Brooks, et al., 2015).

Para medir la diversidad genotípica de los MLG en cada departamento, se evaluaron los siguientes índices: la probabilidad de seleccionar los genotipos en la proporción en que se encuentran en la población, por medio del índice de Shannon (H) (Shannon y Weaver, 1963); la diversidad genotípica a partir del índice de Stoddart y Taylor (G) (Stoddart y Taylor, 1988); la probabilidad de obtener dos genotipos diferentes al muestrearlos al azar mediante el índice de diversidad de Simpson (λ) (Simpson, 1949); la abundancia de genotipos en cada departamento mediante el índice de igualdad (E_5) (Pielou, 1975; Grünwald et al., 2003); y el grado de

reproducción clonal determinado por la fracción clonal (*CF*) (Zhan et al., 2003). Por último, se realizó un submuestreo aleatorio mediante el cálculo de la rarefacción de Jack-knife, para una estimación comparable de los índices anteriormente mencionados entre todas poblaciones a pesar de sus tamaños poblacionales diferentes. Todos los análisis se realizaron con el paquete *poppr* v2.9.3 (Kamvar et al., 2014; Kamvar, Brooks, et al., 2015).

3.2.3 Desequilibrio de ligamiento

Para estimar la probabilidad de recombinación genética en los departamentos, se midió el desequilibrio de ligamiento (DL), es decir, la asociación no azarosa entre alelos de distintos loci. Para estimar el DL, se calculó el índice de asociación estandarizado (\bar{R}_d) (Brown et al., 1980) para los departamentos con un número poblacional superior a 20, usando los SNP's en formato genind. Para la estimación, se probó una hipótesis nula de asociación azarosa de los alelos ($\bar{R}_d = 0$) por medio de una simulación de 999 réplicas de los datos, y se calculó el p-valor con el paquete *poppr* v2.9.3 (Kamvar et al., 2014; Kamvar, Brooks, et al., 2015).

3.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ESPACIAL

3.3.1 Reconstrucción filogenética de *maximum likelihood* (ML)

Para determinar la relación evolutiva entre las muestras de *Boeremia noackiana* obtenidas de los distintos departamentos, se construyó una filogenia de *maximum likelihood* (ML). Para esto, inicialmente se utilizó el objeto VCF con las variantes SNP's para crear un alineamiento múltiple de los aislamientos, por medio del programa TASSEL v5.2.87 (Bradbury et al., 2007), utilizando a *Boeremia exigua* como grupo externo. Posteriormente, se realizó la búsqueda y evaluación del árbol de ML con el criterio de convergencia automática de bootstrapping, donde se utilizó GTR (Tavare, 1986) como modelo de sustitución, y la distribución GAMMA y proporción de sitios

invariantes como modelos de tasa de heterogeneidad a través de RA-ML-NG v1.1.0 (Stamatakis, 2014). Finalizando, la mejor topología con sus valores de soporte fue graficada mediante el paquete *ggtree* v3.2.1 de R (R Core Team, 2022; Yu et al., 2017).

3.3.2 Red de expansión mínima (MSN)

Para visualizar el grado de conectividad genética entre las poblaciones, se realizó una red de expansión mínima (MSN), donde los MLG obtenidos anteriormente se representan como nodos conectados entre sí por sus distancias genéticas. El análisis fue realizado a partir de las variantes SNP's en formato genind y el cálculo de distancia genética entre los genotipos (distancia de Hamming) y la visualización de la red se realizó a partir del paquete *poppr* v2.9.3 (Kamvar et al., 2014; Kamvar, Brooks, et al., 2015).

3.3.3 Análisis de componentes principales (ACP)

Todos los análisis fueron realizados en R (R Core Team, 2022). Para observar la estructura poblacional, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), donde se redujeron las dimensiones de los datos, condensando las variables correlacionadas en un menor número de componentes principales no relacionados, que explican la mayor parte de la varianza. Para ello, los datos de las variantes SNP's en un objeto de tipo genlight, con los datos geográficos asignados como strata, por medio del paquete *vcfR* v1.12.0 (Knaus y Grünwald, 2016, 2017). Posteriormente, se estimó el ACP mediante *adegenet* v2.1.7 (Jombart, 2008; Jombart y Ahmed, 2011) (Apéndice G). Finalmente, los resultados fueron graficados con el paquete *ggplot2* v3.3.6 (Wickham, 2016).

3.3.4 Análisis discriminante de componentes principales (DAPC)

Para maximizar y dividir la varianza entre las muestras por medio de la selección de poblaciones definidas *a priori*, y calcular la probabilidad de cada aislado de pertenecer a cada departamento, se realizó un análisis discriminante de componentes principales (DAPC). Para los

análisis, se utilizaron las variantes SNP's en un objeto *genlight*, con su asignación de datos geográficos. Para el análisis, inicialmente se transformaron las variantes SNP's mediante un ACP y se seleccionaron 90 componentes principales, los cuales describieron más del 90% de la varianza (Apéndice H). Posteriormente, se realizó el análisis discriminante con los departamentos definidos *a priori* como agrupaciones, y se escogieron tres funciones discriminantes, que acogieron la mayor cantidad de información de las variantes (Apéndice H).

Para identificar si las poblaciones del patógeno se estructuran de forma distinta a las poblaciones de los departamentos conocidos, se realizaron otros dos DAPC. Para el primero, se cuantificaron las posibles agrupaciones genéticas en las que se puede estructurar el patógeno sin tomar en cuenta el número original de departamentos, mediante la función *find.clusters*, que usa el algoritmo de agrupamiento K-means basado en el criterio de información bayesiano (BIC), para la búsqueda de un número K de grupos genéticos óptimos que expliquen la mayor parte de la varianza de los datos (Apéndice I). Posteriormente, se realizó otro DAPC donde se utilizaron las variedades de frijol de donde fueron tomadas las muestras del patógeno como grupos *a priori* (Apéndices J y K). Los análisis se realizaron con el paquete *adegenet* v2.1.7 (Jombart, 2008; Jombart y Ahmed, 2011) y los resultados se graficaron con *ggplot2* v3.3.6 (Wickham, 2016).

3.3.5 Estructura genética espacial

Para observar la estructura poblacional de las muestras desde una perspectiva geográfica y estimar la proporción de SNP's que se originaron en una determinada población ancestral K, se calcularon los coeficientes de ascendencia de cada muestra por medio del paquete *tess3r* v1.1.0 de R (Caye et al., 2015). Para el cálculo, se usaron las coordenadas geográficas en formato decimal de los lugares donde fueron muestreados los aislamientos. Los coeficientes de ascendencia junto con los datos geográficos se graficaron por medio del paquete *ggplot2* v3.3.6 (Wickham, 2016).

4. RESULTADOS

4.1 VARIANTES SNP'S EN FORMATO VCF

Con el filtrado inicial de SNP's por GQ, heterocigosidad, MAF, datos perdidos y llamados de genotipos, se obtuvo una matriz genotípica compuesta de 65.437 SNP's a partir de 207 muestras de *Boeremia noackiana* (Apéndice L). En el filtrado final fueron eliminadas las muestras emparentadas con *B. exigua* y sin datos geográficos, resultando en una matriz genotípica de 13.105 SNP's para 159 aislamientos. El total de aislamientos por departamento fue de: Antioquía = 40, Boyacá = 15, Cauca = 10, Cundinamarca = 25, Huila = 36, Santander = 3 y Tolima = 30.

4.2 DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

4.2.1 Índices de diversidad y diferenciación genética

Las métricas de diversidad génica (H_{exp}) y distancia genética de Hamming ($h_distance$) mostraron valores bajos para todos los departamentos ($H_{exp} \leq 0,15$; $h_distance \leq 0,120$), siendo Cauca el de mayor diversidad ($H_{exp} = 0,137$), y Antioquia el de menor ($H_{exp} = 0,111$). Por su parte, el departamento con mayor distancia fue Huila ($h_distance = 0,111$), y los de menor fueron Antioquia ($h_distance = 0,092$) y Santander (distancia = 0,060) (Tabla 1).

Los valores de diferenciación entre los departamentos fueron principalmente bajos ($Gst \leq 0,05$). Santander obtuvo los valores más altos ($Gst \geq 0,1$), siendo los más diferenciados Santander con Antioquia ($Gst = 0,1803$), seguido de Boyacá con Antioquia ($Gst = 0,0802$), mientras que la menor diferenciación fue entre Tolima y Huila ($Gst = 0,0239$), Boyacá y Huila ($Gst = 0,0363$) y Cauca con Cundinamarca ($Gst = 0,0367$) (Tabla 2).

Tabla 1.

Distancia genética de Hamming y diversidad génica de B. noackiana

Departamento	N	h_distance	H _{exp}
Antioquia	40	0,092	0,111
Boyacá	15	0,108	0,128
Cauca	10	0,103	0,137
Cundinamarca	25	0,100	0,133
Huila	36	0,111	0,134
Santander	3	0,060	0,130
Tolima	30	0,103	0,130

Nota. N= número de aislamientos, h_distance = distancia genética pareada media basada en la distancia de Hamming, H_{exp} = Diversidad génica de Nei.

Tabla 2.

Diferenciación genética de B. noackiana entre los departamentos

Gst	N	Antioquia	Boyacá	Cauca	Cundinamarca	Huila	Santander
Antioquia	45						
Boyacá	15	0,0802					
Cauca	10	0,0578	0,0699				
Cundinamarca	27	0,0491	0,0589	0,0367			
Huila	38	0,0566	0,0363	0,0486	0,0410		
Santander	3	0,1803	0,1781	0,1624	0,1628	0,1548	
Tolima	30	0,0528	0,0547	0,0461	0,0407	0,0239	0,1611

Nota. Gst = diferenciación genética de Nei, N = número de aislamientos.

4.2.2 Diversidad genotípica por genotipos multilocus (MLG)

El total de MLG observados fue de 102, donde Antioquia (MLG = 30) y Huila (MLG = 26) fueron los departamentos con mayor diversidad de genotipos (Tabla 3). Los departamentos que compartieron más genotipos entre ellos fueron Tolima y Huila con un total de 5, mientras el departamento con más genotipos únicos fue Antioquia, con un total de 28, también se observó que todos los genotipos de Santander fueron únicos (Tabla 3).

Tabla 3.*MLG totales, únicos y compartidos de B. noackiana en los departamentos*

MLG\Departamento	Antioquia (N = 45)	Boyacá (N = 15)	Cauca (N =10)	Cundinamarca (N = 27)	Huila (N = 38)	Santander (N = 3)	Tolima (N = 30)
MLG totales	30	13	9	18	26	2	17
MLG únicos	28	12	5	15	20	2	10
MLG compartidos	2	1	4	3	6	0	7
Antioquia	-	-	-	-	-	-	-
Boyacá	0	-	-	-	-	-	-
Cauca	1	0	-	-	-	-	-
Cundinamarca	1	0	3	-	-	-	-
Huila	1	1	1	1	-	-	-
Santander	0	0	0	0	0	-	-
Tolima	2	0	2	1	5	0	-

El análisis eMLG basado en rarefacción se realizó con un número poblacional comparable de 18, por lo tanto, se realizó únicamente en los departamentos con tamaño poblacional mayor a 18, es decir, Antioquia, Cundinamarca, Huila y Tolima (Apéndice M). El total de eMLG mostró menor número de genotipos entre los departamentos ($MLG \leq 15$) cuando se consideró el mismo tamaño poblacional (Tabla 4). Los valores obtenidos de fracción clonal (CF) fueron altos en todos los departamentos, siendo el de menor valor Santander ($CF = 0,67$) y el de mayor Cauca ($CF = 0,9$), mientras el índice de Shannon (H) mostró valores medios para todos a excepción de Santander, que fue el más bajo ($H = 0,6$). Los departamentos que mostraron mayor valor de diversidad según el índice de Stoddart y Taylor (G) fueron Huila ($G = 20,9$) y Antioquia ($G = 18,6$), y la mayoría tuvo valores altos de lambda, siendo el más bajo Santander ($\lambda = 0,444$). La uniformidad genotípica según el E5 fue alta en todos los departamentos (Tabla 4).

4.2.3 Desequilibrio de ligamiento

Para estimar la recombinación en los departamentos, se midió el DL a partir del \bar{R}_d . Los valores obtenidos fueron significativos ($p\text{-valor} \leq 0,01$), por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula

de ausencia de equilibrio de ligamiento puesta a prueba en este análisis (Tabla 4) (Apéndice N). Esto indican falta de apareamiento aleatorio y altos niveles de clonalidad en las muestras.

Tabla 4.

Índices de diversidad genotípicas y MLG de B. noackiana en los departamentos

Departamento	N	MLG	eMLG	CF	H	G	Lambda	E5	\bar{R}_d
Antioquia	40	30	15,01	0,75	3,21	18,6	0,946	0,738	0,0274*
Boyacá	15	13	-	0,87	2,52	11,84	0,915	0,945	-
Cauca	10	9	-	0,9	2,16	8,33	0,88	0,951	-
Cundinamarca	25	18	13,92	0,72	2,75	13,3	0,925	0,835	0,0394*
Huila	36	26	15,18	0,72	3,15	20,9	0,952	0,886	0,0402*
Santander	3	2	-	0,67	0,64	1,8	0,444	0,899	-
Tolima	30	17	12,61	0,57	2,70	13,24	0,924	0,879	0,068*

Nota. N = número de muestras, MLG = MLG observados basado en una distancia genética de 0.009, eMLG: MLG esperados bajo un tamaño poblacional \geq a 18 basado en rarefacción, CF = fracción clonal, H = índice de Shannon, G = índice de Stoddart y Taylor, Lambda = índice de Simpson, E5 = índice de uniformidad, \bar{R}_d = índice estandarizado de asociación (*p-valor \leq 0,01).

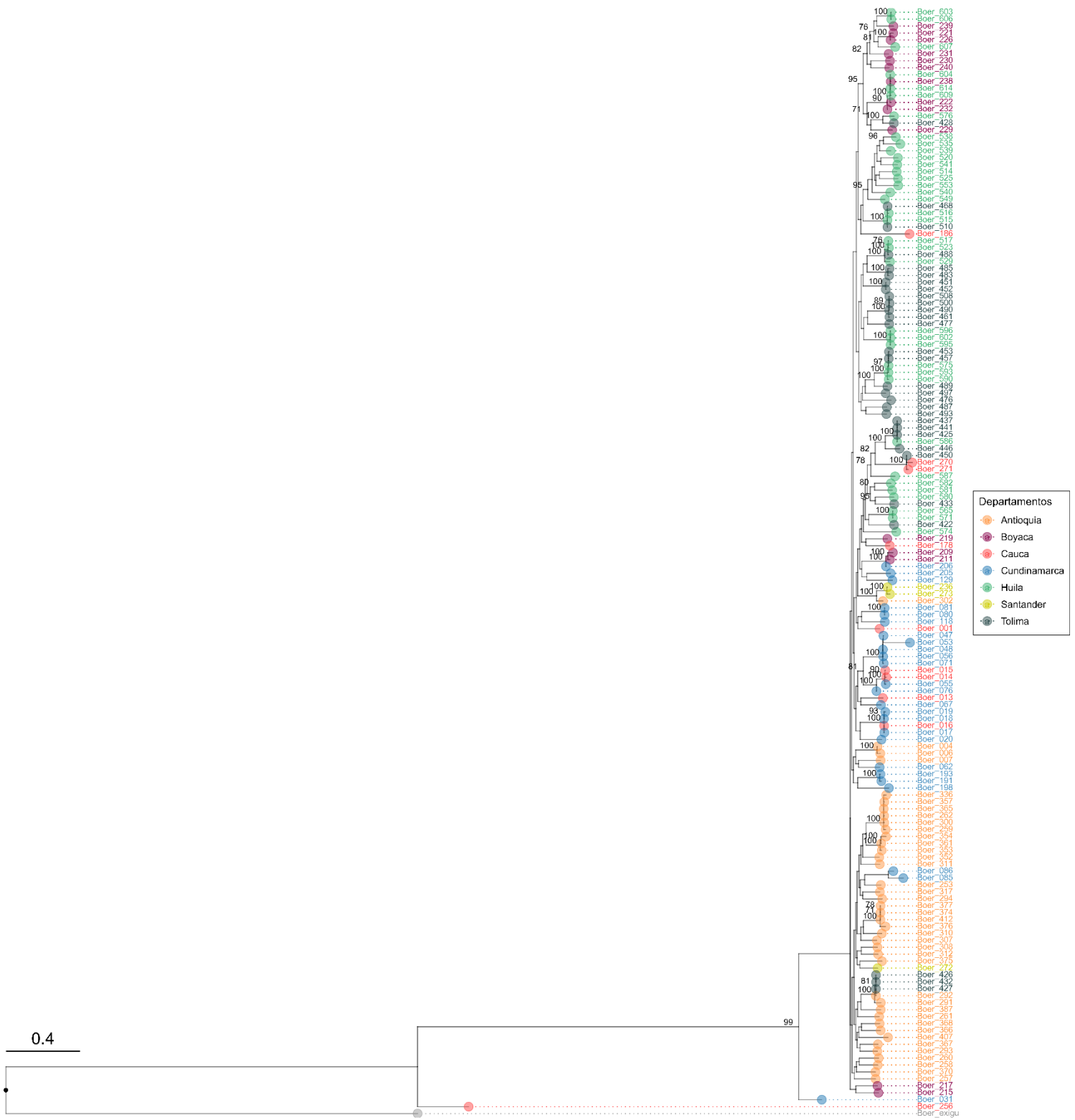
4.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ESPACIAL

4.3.1 Relación evolutiva entre las muestras

La filogenia de ML mostró alta cercanía evolutiva y similitud genética entre las muestras. La muestra Boer_256 perteneciente al departamento de Cauca fue la más diferenciada y cercana al outgroup.

Figura 3.

Reconstrucción filogenética de ML de aislamientos de *B. noackiana*



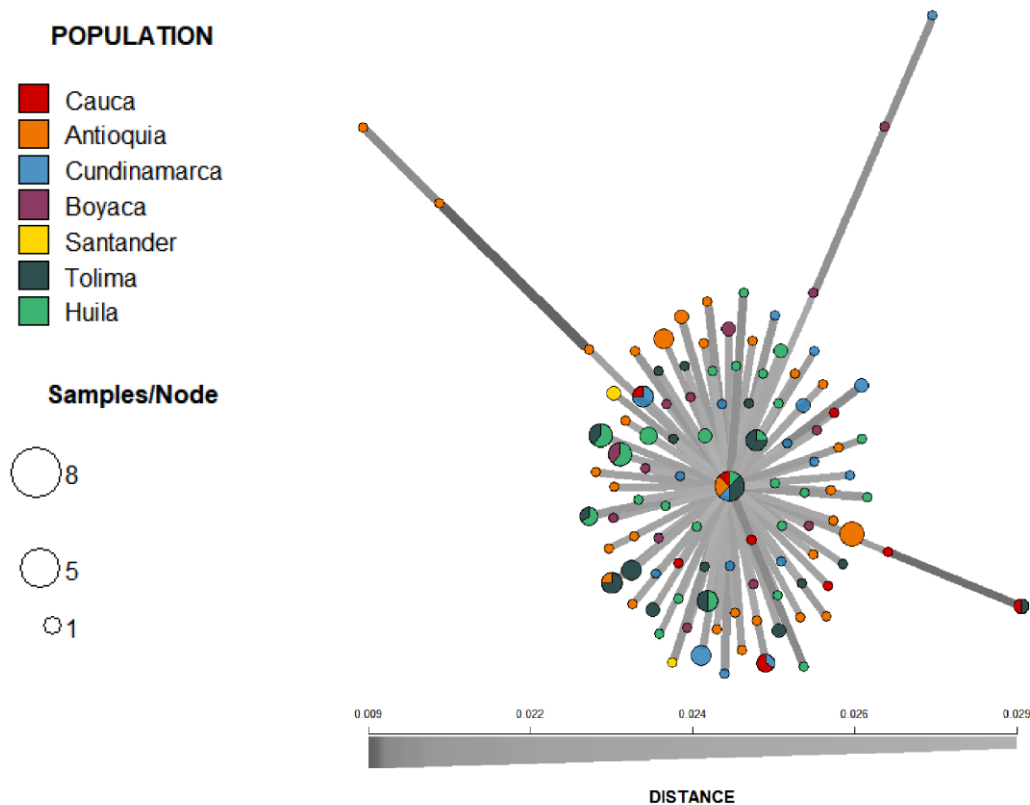
Nota. Árbol de ML a base de 13.105 SNP's. Valores sobre las ramas = soportes de bootstrap > 70.

4.3.2 Red de expansión mínima de genotipos

La MSN no mostró genotipos dominantes en los departamentos, y a su vez, hubo poca distancia genética y ausencia de conexión entre la mayoría de los genotipos (Figura 4). El genotipo MLG.148 estuvo presente en Antioquia, Cauca, Cundinamarca, Huila y Tolima. Se observó concordancia con el análisis de MLG, Antioquia tuvo más genotipos únicos, y en general hubo pocos genotipos compartidos, siendo Tolima el que comparte más con otros departamentos, y Tolima y Huila los departamentos que más comparten genotipos entre sí.

Figura 4.

Red de expansión mínima de genotipos de B. noackiana



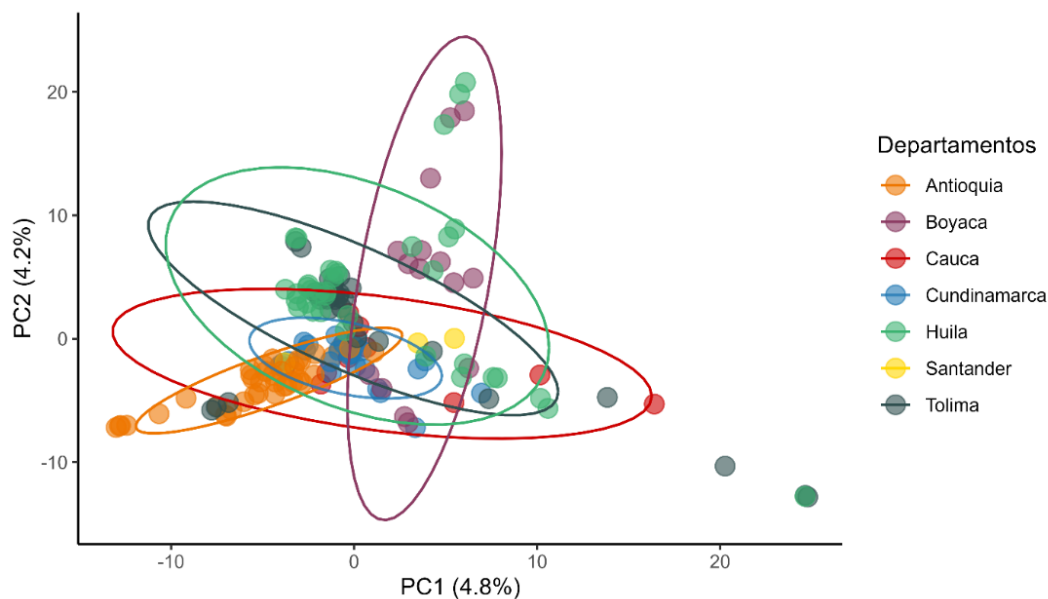
Nota. Cada MLG es representado por un nodo (círculo), y las conexiones (líneas) representan la distancia mínima entre las muestras. Population = departamentos, Sample/node = Número de individuos por cada genotipo multilocus, Distance = escala de distancia genética.

4.3.3 Análisis de componentes principales

El ACP mostró que los dos primeros componentes principales retuvieron bajos porcentajes de varianza (PC1 = 4,8%, PC2 = 4,3%) Pese a lo anterior, se observó que todas las muestras están bastante asociadas, y las de Antioquia forman un grupo compacto (Figura 5).

Figura 5.

Análisis de componentes principales de muestras de *B. noackiana*

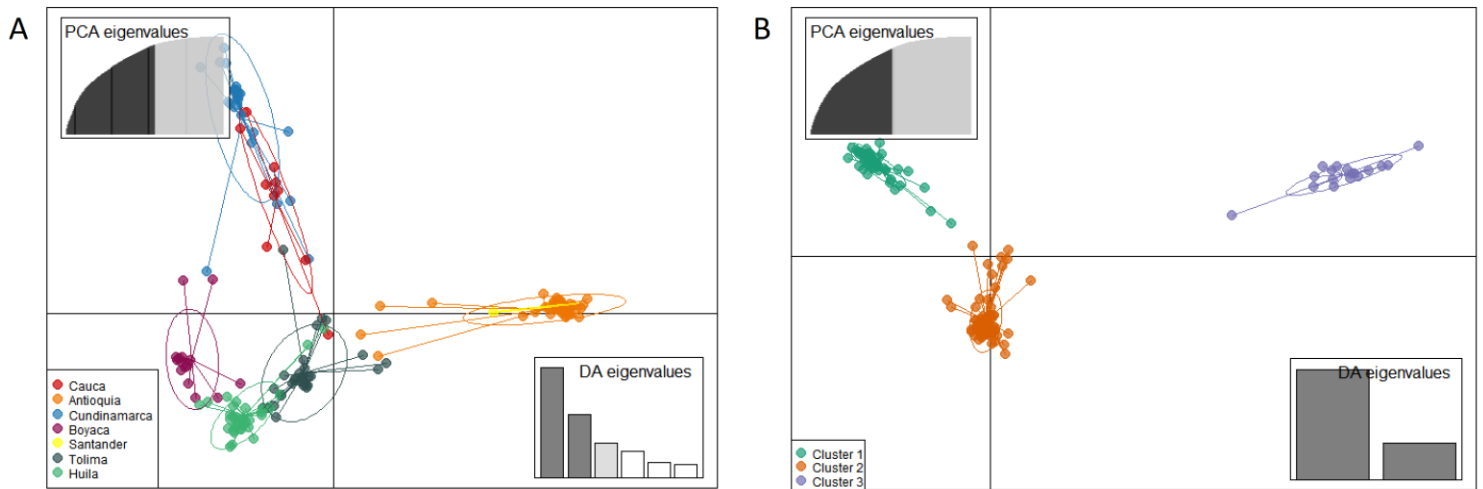


4.3.4 Análisis discriminante de componentes principales (DAPC)

El ACP realizado en el DAPC por departamentos mostró una tendencia marcada de cada departamento a agruparse de forma independiente. Se observaron agrupaciones cercanas entre Cundinamarca con Cauca, Antioquia con Santander, y Huila con Tolima y Boyacá (Figura 6A). En los resultados del DAPC realizado para la búsqueda de grupos genéticos se obtuvo un número de grupos K igual a 3 basado en el BIC (Apéndice O). Los resultados de este ACP mostraron tres grupos bien definidos (Figura 6B). Por otra parte, el DAPC realizado con las variedades de frijol seleccionadas *a priori* no mostró patrones de estructura ni agrupaciones (Apéndice Q).

Figura 6.

Gráficos de dispersión del análisis discriminante de componentes principales



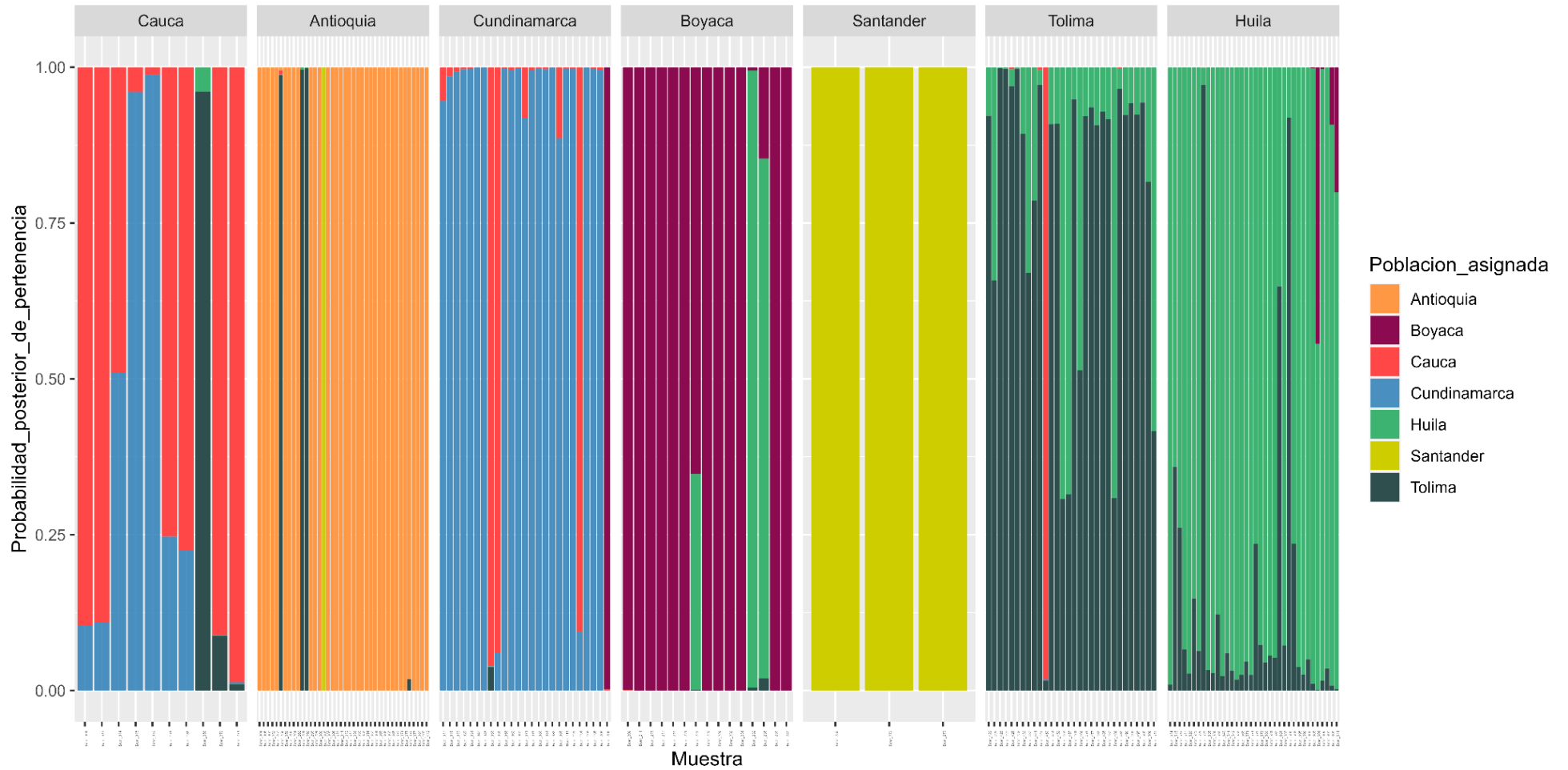
Nota. (A) Gráfico de dispersión de las distancias entre los departamentos seleccionados *a priori* en el primer DAPC. (B) Gráfico de dispersión de las distancias entre los grupos genéticos calculados en el segundo DAPC. PCA eigenvalues = componentes principales y su nivel de varianza; DA eigenvalues = funciones discriminantes.

En el DAPC realizado con los departamentos seleccionados *a priori* los cálculos de probabilidad de pertenencia mostraron a Antioquia, Boyacá y, Cundinamarca y Santander como los departamentos con menos variabilidad. Algunas muestras de Cauca presentaron altas probabilidades de proceder de Cundinamarca, del mismo modo entre Tolima y Huila, y Boyacá con Huila. Finalmente, se observaron muestras con probabilidad de pertenecer a Tolima en la mayoría de los departamentos, concordando con lo visto en el análisis de MLG (Figura 7).

El DAPC realizado por agrupaciones genéticas mostró que la mayoría de los aislamientos de Cauca, Cundinamarca, Santander, Tolima y Huila corresponden al grupo genético 3. Por su parte, las muestras de Antioquia pertenecieron en su mayoría al grupo 1, de igual forma, las muestras de Boyacá y algunas muestras de Huila pertenecieron al grupo 3 (Figura 8).

Figura 7.

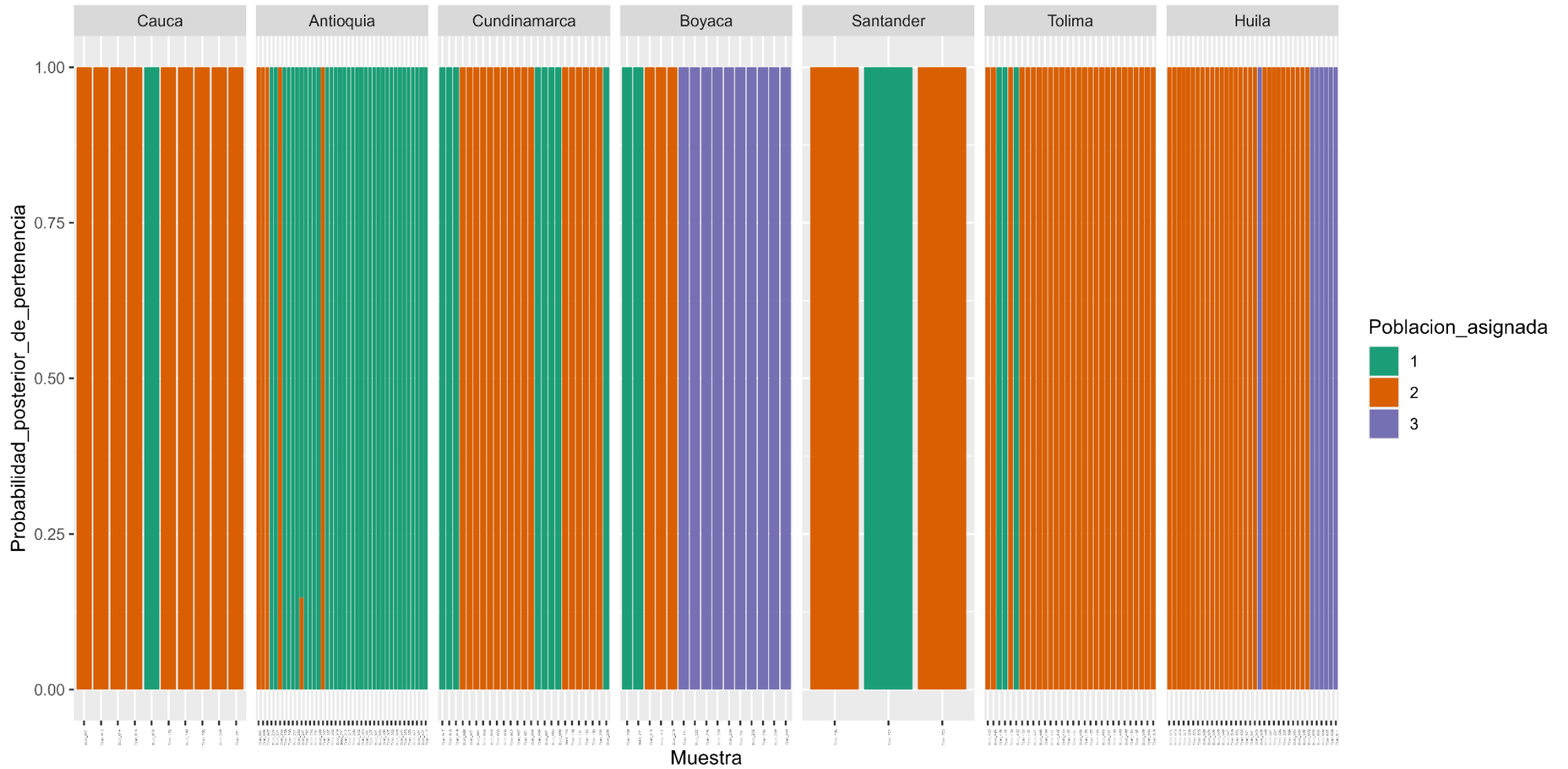
Probabilidad posterior de cada muestra de B. noackiana de pertenecer a los departamentos



Nota. Probabilidad posterior de pertenencia = proporción de ADN que pertenecen a un departamento asignado; Población asignada = departamentos probables.

Figura 8.

Probabilidad posterior de cada muestra de B. noackiana de pertenecer a un grupo genético (K = 3)



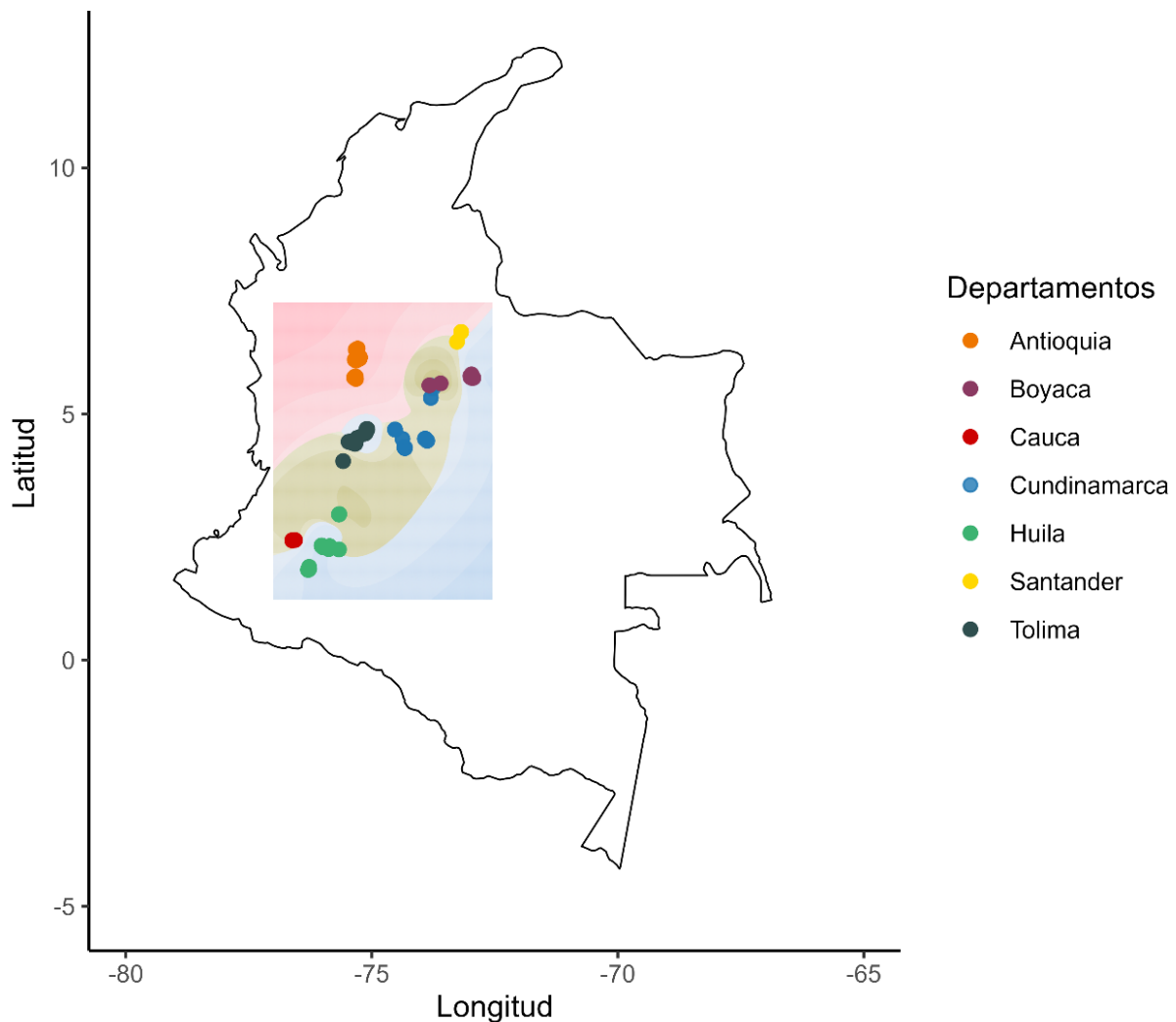
Nota. Probabilidad posterior de pertenencia = proporción de ADN que pertenecen a un grupo genético asignado; Población asignada = grupos genéticos probables.

4.3.5 Estructura genética espacial

Para el análisis de ancestría, se estimaron un total de $k = 3$ poblaciones ancestrales, acorde con los grupos genéticos estimados en el DAPC. Las muestras de Antioquia se agruparon en una única población, junto a una de Santander (rosado). A su vez, las de Cundinamarca y parte de Boyacá, Huila, Santander y Tolima se agruparon juntas (marrón). El último grupo fue conformado por Boyacá, Huila y Tolima (azul) (Figura 9) (Apéndice P).

Figura 9.

Probabilidad de pertenencia de B. noackiana a las poblaciones ancestrales



Nota. Mapa geográfico con coeficientes de ascendencia para $K = 3$ poblaciones ancestrales.

5. DISCUSIÓN

5.1 ANÁLISIS DE LAS VARIANTES SNP'S

En el presente estudio, se usaron marcadores moleculares tipo SNP para realizar el primer análisis de diversidad genética y estructura poblacional de *Boeremia noackiana*, hongo causal de la mancha anillada del frijol en Colombia. No todos los marcadores moleculares resultan eficientes a la hora de medir la diversidad genética en patógenos fúngicos como *B. noackiana*, que generalmente presentan diversidad y diferenciación reducida, debido al número limitado de mecanismos que les permiten recombinación genética (Atallah y Subbarao, 2012; Gladieux et al., 2015; LeBlanc et al., 2020). Los marcadores de tipo SNP's, usados en los análisis realizados, son herramientas de alta especificidad que permiten identificar variaciones poblacionales con una representación reducida del genoma de los patógenos (Milgroom, 2017; LeBlanc et al., 2020). En este estudio, se usaron un total de 13.105 SNP's, que representaron menos del 0,04% de un genoma de 35 Mpb como el de *B. exigua*, individuo de referencia. Pese al porcentaje reducido, los SNP's permitieron la identificación de patrones de diversidad y estructura genética de forma eficiente.

Los errores en el proceso de secuenciación debido a los diferentes pasos en el protocolo de GBS y durante el llamado de variantes pudieron influenciar los resultados de los análisis, al generar SNP's falsos o en posiciones equivocadas (Narum et al., 2013; Grünwald et al., 2016) , sin embargo, el uso de diversos filtros de SNP's reduce los errores de secuenciación (Carleson et al. 2019). En este estudio se aplicaron cinco diferentes filtros para eliminar SNP's erróneos, aumentar la calidad de los SNP's utilizados e incrementar la veracidad de los resultados.

5.2 DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Boeremia noackiana*

La mayor parte de los análisis de diversidad genética realizados mostraron que las poblaciones de *Boeremia noackiana* en los diferentes departamentos son altamente clonales y poco diversas. Todos los departamentos mostraron ser cercanos genéticamente y tener poca diversidad génica, no obstante, se observaron valores medios de diferenciación en G_{st} en algunos de ellos, siendo los valores más altos los de Santander, sin embargo, debido al bajo número de muestreo del departamento, los resultados obtenidos no son comparables con los de los demás departamentos (Tabla 1 y 2). Los resultados del índice de asociación apoyan el LD, es decir, la ausencia de recombinación azarosa entre los alelos de los departamentos con mayor tamaño poblacional. Esto indica alta similitud y clonalidad en los departamentos (Atallah y Subbarao, 2012) (Tabla 4).

Por su parte, el análisis de MLG mostró alta diversidad genotípica y múltiples genotipos únicos en los departamentos (Tabla 3), lo cual fue soportado por los estadísticos de diversidad como H , G , Λ y E_5 (Tabla 4). Pese a esto, el índice de fracción clonal (CF) soportó los altos niveles de clonalidad, y se observaron genotipos compartidos entre las poblaciones, siendo el genotipo MLG.148 el único presente en cinco de los departamentos (Tabla 3).

Los valores de LD, la presencia de genotipos comunes, y la poca diversidad genética son pruebas robustas de que *B. noackiana* se reproduce asexualmente (Tibayrenc et al., 1991). Pese a esto, se observó alta diversidad de genotipos, prueba de que el patógeno tiene capacidad de diferenciarse. La reproducción asexual es el método de reproducción mediante el cual los únicos mecanismos que generan variabilidad genética son las mutaciones y el flujo génico, además de los mecanismos especializados que poseen los hongos, como lo son el parasexualismo y la heterocariosis (Agrios, 2005; Manzo Sánchez et al., 2005; Milgroom, 2017). Patrones de diversidad similares a los obtenidos se han observado ampliamente en fitopatógenos (Taylor et al.,

1999, 2015), y pueden ser evidencia de que el patógeno presenta recombinación restringida, es decir, se reproduce mayormente de forma clonal y los eventos de recombinación pueden ser poco frecuentes (Tibayrenc y Ayala, 2012; Taylor et al., 2015), mientras la poca diferenciación puede deberse a factores como la acumulación de mutaciones (Tibayrenc y Ayala, 2012; Milgroom, 2017). Hasta el momento no se han reportado eventos de reproducción sexual, parasexualidad o heterocariosis en *B. noackiana* (Miranda y Garzón, 2021), sin embargo, la ausencia de información sobre su reproducción, el ciclo de vida y la ploidía no permiten hacer conclusiones más profundas.

5.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Boeremia noackiana*

En los análisis de estructura poblacional no se observó estructura a nivel de departamento, en cambio, se determinó que el patógeno se estructura a un nivel geográfico más amplio.

La reconstrucción filogenética de ML realizada a partir de los SNP's reveló la cercanía evolutiva entre las muestras y se evidenció nuevamente la similitud genética del patógeno independiente de su posición geográfica (Figura 3).

El MSN tampoco mostró grupos grandes o conexiones entre genotipos, y los valores de distancia genética entre los genotipos fueron bajos, sin embargo, se observaron genotipos compartidos entre algunos departamentos y alta diversidad de genotipos, resultado acorde con el análisis de MLG (Figura 4). Los aislamientos procedentes de distintos departamentos, pero agrupados en los mismos genotipos pueden considerarse como clones, lo cual soporta la hipótesis de flujo genético entre los departamentos. También se observó que el genotipo MLG.148 está presente en Antioquia, Cauca, Cundinamarca, Huila y Tolima, y se posiciona en el centro de la red, de donde se conectan los demás genotipos. Estos resultados determinan que el genotipo

MLG.148 tiene alta probabilidad de ser el linaje clonal central de *B. noackiana*, del cual surgieron y se diferenciaron los demás linajes y genotipos, incluyendo los de Boyacá y Santander.

Por su parte, el ACP no acumuló un porcentaje alto de varianza en los primeros componentes principales, por lo cual no fue posible observar patrones de estructura poblacional con el análisis (Figura 5). La falta de varianza en los componentes principales puede deberse a que la mayoría de las variables no se correlacionan antes de ser transformadas en componentes principales. En el caso del análisis realizado en este estudio, puede que no haya alta correlación entre los SNP's y las poblaciones de los departamentos, por lo tanto, los primeros componentes principales no acumulan un porcentaje alto de varianza y no se observan patrones al graficarlos.

A diferencia del resultado del ACP, el análisis discriminante si mostró patrones de estructura poblacional. Debido a que el DAPC permite realizar gráficos de dispersión con un número de componentes principales que expliquen mayor parte de la varianza, se pudieron observar de forma más evidente los patrones de agrupación de los departamentos y grupos genéticos (Figura 6). El gráfico de probabilidad posterior soportó lo observado en el gráfico de dispersión, Antioquia resultó ser el departamento más diferenciado, seguido de Santander, Boyacá y Cundinamarca. Por otra parte, hubo alta relación entre los departamentos de Huila con Tolima, y Cauca con Cundinamarca y Boyacá con Huila (Figura 7). Estas mismas relaciones entre departamentos se reflejaron en el MSN. El DAPC realizado con grupos genéticos reflejó que estas relaciones pueden estar estructurando la población de *B. noackiana* a un nivel geográfico diferente al departamental, abarcando territorios más grandes que agrupan varios departamentos (Figura 8). Antioquia nuevamente se identificó como un departamento altamente diferenciado, con la mayoría de sus muestras en el grupo genético 1, y de igual forma se observó a Boyacá pertenecer en mayoría al grupo 3. Los demás departamentos reflejaron cercanía genética entre ellos, agrupándose juntos

en el grupo genético 2, incluyendo algunas muestras de Boyacá. También se observó de nuevo la relación de Boyacá con Huila, al haber muestras de Huila en el grupo 3, mismo grupo de Boyacá. En el DAPC realizado por variedades de frijol no se evidenció estructura poblacional, lo cual demostró que las diferencias entre las variedades de plantas hospederas no influyen en la diferenciación del patógeno, en cambio, los factores ambientales y el flujo genético pueden ser los responsables de los patrones de agrupación.

Finalmente, la estimación de poblaciones ancestrales resultó en tres poblaciones, que soportaron los tres grupos genéticos estimados en el análisis discriminante. La primera población ancestral se compuso únicamente por Antioquia, mientras la segunda incluyó muestras de Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander y Tolima. Finalmente, la última población se compuso de muestras de Boyacá, Huila y Tolima (Figura 9).

El análisis filogenético y el MSN no permitieron evidenciar patrones de estructura poblacional, esto debido a que las muestras son muy cercanas evolutivamente y están poco diferenciadas, sin embargo, el DAPC y el análisis de estructura espacial si permiten evidenciar los patrones de estructura poblacional, esto debido a que utilizan datos geográficos y estiman agrupaciones genéticas para aumentar la varianza en el análisis. Los patrones observados de estructura y la agrupación de la mayoría de los departamentos en el grupo genético 2 y en la segunda población ancestral K soportan la hipótesis de la presencia de flujo genético (Boeger et al., 1993). Debido a la alta clonalidad observada en *B. noackiana*, el flujo genético entre regiones geográficas facilita la similitud genética entre ellas (Manzo-Sánchez et al., 2005). Esto se ha visto en estudios de estructura genética similares, realizados con patógenos fúngicos de plantas de interés comercial como leguminosas y plantas ornamentales (Kamvar, et al., 2015; Carleson et al., 2019; Chaves et al., 2019; Bar et al., 2021; Tabima et al., 2020, 2021), en los cuales se discutió

que los genotipos compartidos entre regiones geográficas separadas, y la estructuración en grandes grupos genéticos compuesto por varias regiones podrían ser resultado de flujo genético, mediado por la dispersión del patógeno por el transporte humano. Se sabe que el uso de semillas infectadas y el mal manejo de residuos vegetales de plantaciones afectadas por la mancha anillada propicia la dispersión del patógeno, por lo tanto, el movimiento de material vegetal infectado por obra antropogénica pudo ser la razón del flujo genético entre grandes extensiones geográficas (Schwartz et al., 1981; Schoonhoven y Pastor-Corrales, 1987). Por el contrario, la ausencia de flujo genético de Antioquia con otros departamentos puede estar influenciando su estructuración y diferenciación.

Otro factor que propicia el flujo génico en hongos es la dispersión de esporas. *B. noackiana* es un hongo ascomiceto cuya dispersión se realiza por esporas asexuales llamadas conidios (Boerema et al., 2004; Agrios, 2005; Aveskamp et al., 2010). En estudios realizados en hongos parásitos que comparten la misma estrategia de dispersión (Ayala-Zermeño, 2012; Coventry, 2012), los conidios alcanzaron rangos de dispersión de entre 100m y 150m, sin embargo, actualmente no existe información sobre el rango de dispersión de las esporas de *B. noackiana*, por lo tanto, se recomienda profundizar en su estudio en para próximos estudios.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los análisis de diversidad génica, diferenciación y el índice de asociación permiten concluir que *Boeremia noackiana*, agente causal de la mancha anillada del frijol en Colombia, posee poca diversidad genética y está poco diferenciado entre los principales departamentos productores de frijol, lo cual puede ser resultado de la alta clonalidad y la recombinación genética restringida. Tampoco se evidenció estructura poblacional marcada entre

los departamentos probablemente debido al flujo genético propiciado en mayor medida por el hombre y la dispersión de esporas, sin embargo, se evidenciaron indicios de estructuración en la población de Antioquia a causa de la ausencia de flujo genético con otros departamentos. Debido a la importancia que tiene a enfermedad para el país, este estudio proporcionó información relevante para el desarrollo de estrategias de manejo y control de la enfermedad. Se recomienda continuar con el estudio de *B. noackiana* y otros agentes causales de la mancha anillada, y ampliar la información sobre su ciclo de vida, ploidía y estrategias reproductivas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeln, E. C. A., Stax, A. M., Gruyter, J. de, y Van der Aa. (2002). Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. *Mycological Research*, 106(4), 419–427.
<https://doi.org/DOI: 10.1017/S0953756202005804>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press.
- Amado, N., Quieroga, J. K., Torres, D. Y., y Balamba, J. E. (2014). *Situación actual y perspectivas del cultivo de frijol*.
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*.
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
<https://qubeshub.org/resources/fastqc>
- Araya, C. M. (2003). Coevolución de interacciones hospedante-patógeno en frijol común. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3), 221–228.
- Arcos, J., y Rojas, D. C. (2019). *Recomendaciones para la producción de grano de frijol biofortificado en Colombia*. www.harvestplus.org
- Arias-Restrepo, J. H., Rengifo-Martinez, T., y Jaramillo-Carmona, M. (2007). *Manual técnico: buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de frijol voluble* (1a ed.). CORPOICA.
- Arnaud-Haond, S., Duarte, C. M., Alberto, F., y Serrao, E. A. (2007). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, 16(24), 5115–5139.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03535.x>
- Atallah, Z. K., y Subbarao, K. V. (2012). Population Biology of Fungal Plant Pathogens. En M. D. Bolton y B. P. H. J. Thomma (Eds.), *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols* (pp. 333–363). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_20

- Aveskamp, M. M., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., y Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise Phoma and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, *65*, 1–60. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.65.01>
- Aveskamp, M. M., Woudenberg, J. H. C., De Gruyter, J., Turco, E., Groenewald, J. Z., y Crous, P. W. (2009). Development of taxon-specific sequence characterized amplified region (SCAR) markers based on actin sequences and DNA amplification fingerprinting (DAF): A case study in the Phoma exigua species complex. *Molecular Plant Pathology*, *10*(3), 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00540.x>
- Ayala-Zermeño, M. (2012). *Persistencia y dispersión del hongo entomopatógeno Isaria fumosorosea Wize utilizado en el control biológico de la mosquita blanca (Hemiptera: Aleyrodidae)*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3538.2169>
- Bar, I., Sambasivam, P. T., Davidson, J., Farfan-Caceres, L. M., Lee, R. C., Hobson, K., Moore, K., y Ford, R. (2021). Current population structure and pathogenicity patterns of *Ascochyta rabiei* in Australia. *Microbial Genomics*, *7*(7). <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mgen.0.000627>
- Bever, J. D., Mangan, S. A., y Alexander, H. M. (2015). Maintenance of Plant Species Diversity by Pathogens. *Source: Annual Review of Ecology*, *46*, 305–325. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-1>
- Blair, M. W., Garzón, L. N., Jara, C., Castellanos, G., Mosquera, G., Ligarreto, G. A., Oliveros, O. A., Rivera, C. M., y Villarraga, P. (2011). *Resistance to and diversity of Ascochyta blight in common beans*.

- Boeger, M., Chen, R. S., y McDonald, B. A. (1993). Gene Flow Between Geographic Populations of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorph *Septoria tritici*) Detected with Restriction Fragment Length Polymorphism Markers. *J. Phytopathology*, 83, 1148–1154.
- Boerema, G. H., Crüger, G., Gerlagh, M., y Nirenberg, H. (1981). *Phoma exigua* var. *diversispora* and related fungi on Phaseolus beans / *Phoma exigua* var. *diversispora* und verwandte Pilze an Phaseolus-Bohnen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection*, 88(10), 597–607.
<http://www.jstor.org/bibliotecavirtual.uis.edu.co/stable/43216228>
- Boerema, G. H., de Gruyter, J., Noordeloos, M. E., y Hamers, M. E. C. (2004). *phoma identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture*. CABI.
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., y Buckler, E. S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19), 2633–2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., y Vanderleyden, y J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.)-model food legumes. En *Plant and Soil* (Vol. 252).
<http://www.phaseolus.net>
- Brown, A. H. D., Feldman, M. W., y Nevo, E. (1980). MULTILOCUS STRUCTURE OF NATURAL POPULATIONS OF *HORDEUM SPONTANEUM*. *Genetics*, 96(2), 523–536.
<https://doi.org/10.1093/genetics/96.2.523>
- Burbano-Figueroa, Ó. (2020). Plant resistance to pathogens: A review describing the vertical and horizontal resistance concepts. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 245–255.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.006>

- Burdon, J. J., y Silk, J. (1997). Sources and Patterns of Diversity in Plant-Pathogenic Fungi. *Phytopathology*, 87(7), 664–669. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.7.664>
- Carleson, N. C., Fieland, V. J., Scagel, C. F., Weiland, J. E., y Grünwald, N. J. (2019). Population Structure of *Phytophthora plurivora* on *Rhododendron* in Oregon Nurseries. *Plant Disease*, 103(8), 1923–1930. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2187-RE>
- Cavalcante, A. G., Lemos, L. B., Meirelles, F. C., Cavalcante, A. C. P., y de Aquino, L. A. (2020). Thermal sum and phenological descriptions of growth stages of the common bean according to the BBCH scale. *Annals of Applied Biology*, 176(3), 342–349. <https://doi.org/10.1111/aab.12571>
- Caye, K., Deist, T., Martins, H., Michel, O., y François, O. (2015). TESS3: Fast Inference of Spatial Population Structure and Genome Scans for Selection. *Molecular Ecology Resources*, 16(2), 540–548. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12471>
- Chakraborty, R. (1993). Analysis of genetic structure of populations: meaning, methods and implicatios. En P. P. Majumder (Ed.), *Human Population Genetics* (pp. 189–207). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2970-5_14
- Chaves, S. C., Rodríguez, M. C., Mideros, M. F., Lucca, F., Núñez, C. E., y Restrepo, S. (2019). Determining whether geographic origin and potato genotypes shape the population structure of *Phytophthora infestans* in the central region of Colombia. *Phytopathology*, 109(1), 145–154. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-18-0157-R>
- CIAT. (1982). *Enfermedades Del Frijol Causadas Por Hongos Y Su Control*.
- CIAT. (1983). *Annual Report 1983: Bean Report*.
- Coventry, S. A. (2012). *Factors affecting short and long distance dispersal of fungal pathogens : chickpea ascochyta blight as a model*. School of Agriculture, Food and Wine.

- Deokar, A., Sagi, M., y Taran, B. (2019). Genome-wide SNP discovery for development of high-density genetic map and QTL mapping of ascochyta blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03322-3>
- Ellegren, H., y Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews. Genetics*, *17*(7), 422–433.
- Farahani, S., Talebi, R., Maleki, M., Mehrabi, R., y Kanouni, H. (2019). Pathogenic diversity of *Ascochyta rabiei* isolates and identification of resistance sources in core collection of chickpea germplasm. *Plant Pathology Journal*, *35*(4), 321–329. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.12.2018.0299>
- Faridi, R., Koopman, B., Schierholt, A., Ali, M. B., Apel, S., y Link, W. (2021). Genetic study of the resistance of faba bean (*Vicia faba*) against the fungus *Ascochyta fabae* through a genome-wide association analysis. *Plant Breeding*, *140*(3), 442–452. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/pbr.12918>
- FENALCE. (2022, junio 2). *Estadísticas: Federación Nacional de Cultivadores de Cereales, Leguminosas y Soya - FENALCE*. <https://fenalce.co/estadisticas/>.
- Ferreira, J. J., Campa, A., y Pérez-Vega, E. (2016). Variation in the response to ascochyta blight in common bean germplasm. *European Journal of Plant Pathology*, *146*(4), 977–985. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0974-y>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1997). *FAOSTAT statistical database*. FAO. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999890171702121>

- Garzón, L. N., Blair, M. W., Jara, C., Castellanos, G., Hoyos, A., Mosquera, G., Ligarreto, G. A., Oliveros, O. A., y Villarraga, P. (2011). *Disease reponse of andean breeding lines tested for Ascochyta blight resistance*.
- Gladieux, P., Feurtey, A., Hood, M. E., Snirc, A., Clavel, J., Dutech, C., Roy, M., y Giraud, T. (2015). The population biology of fungal invasions. *Molecular Ecology*, 24(9), 1969–1986. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mec.13028>
- Grünwald, N. J., Goodwin, S. B., Milgroom, M. G., y Fry, W. E. (2003). Analysis of Genotypic Diversity Data for Populations of Microorganisms. *Phytopathology*®, 93(6), 738–746. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.6.738>
- Grünwald, N. J., McDonald, B. A., y Milgroom, M. G. (2016). Population Genomics of Fungal and Oomycete Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 54(1), 323–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-115913>
- Huson, D. H., y Bryant, D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254–267. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj030>
- Jha, A. B., Taran, B., Diapari, M., Sindhu, A., Shunmugam, A., Bett, K., y Warkentin, T. D. (2015). Allele diversity analysis to identify SNPs associated with ascochyta blight resistance in pea. *Euphytica*, 202(2), 189–197. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1254-6>
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart, T., y Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>

- Kamvar, Z. N., Brooks, J. C., y J. Grünwald, N. (2015). Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Front. Genet.*, 6, 208. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00208>
- Kamvar, Z. N., Larsen, M. M., Kanaskie, A. M., Hansen, E. M., y Grünwald, N. J. (2015). Spatial and Temporal Analysis of Populations of the Sudden Oak Death Pathogen in Oregon Forests. *Phytopathology*®, 105(7), 982–989. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0350-FI>
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., y J. Grünwald, N. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Kaur, S., Kimber, R. B. E., Cogan, N. O. I., Materne, M., Forster, J. W., y Paull, J. G. (2014). SNP discovery and high-density genetic mapping in faba bean (*Vicia faba* L.) permits identification of QTLs for ascochyta blight resistance. *Plant Science*, 217–218, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.11.014>
- Khanal, R., Burt, A. J., Woodrow, L., Balasubramanian, P., y Navabi, A. (2014). Genotypic association of parameters commonly used to predict canning quality of dry bean. *Crop Science*, 54(6), 2564–2573. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.02.0113>
- Kimura, M. (1983). *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511623486>
- Klug, W. S., Cummings, M. R., y Spencer, C. A. (2006). *Conceptos de Genética* (8a ed.). Pearson Education.
- Knaus, B. J., y Grünwald, N. J. (2016). VcfR: an R package to manipulate and visualize VCF format data. *BioRxiv*. <http://dx.doi.org/10.1101/041277>

- Knaus, B. J., y Grünwald, N. J. (2017). VcfR: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 44–53. <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12549>
- LeBlanc, N., Cubeta, M. A., y Crouch, J. A. (2020). Population Genomics Trace Clonal Diversification and Intercontinental Migration of an Emerging Fungal Pathogen of Boxwood. *Phytopathology*, 111(1), 184–193. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0219-FI>
- Lepoivre, P., y Baudouin, J. P. (1993). Characterization of the fungal agent causing ascochyta blight of *Phaseolus vulgaris* in Africa and South America. *Bulletin des séances de l'Académie royale des sciences coloniales*, 34(4), 557–566.
- Manzo-Sánchez, G., Canto-Canché, B., y Andrew, J. K. (2005). Hongos patógenos: enemigos versátiles. *Ciencia*, 56(3), 71–75.
- Martin, M. (2011). Cautadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1), 10–12. <http://www-huber.embl.de/users/an->
- McDonald, B. A., y Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. En *Annual Review of Phytopathology* (Vol. 40, pp. 349–379). <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- Milgroom, M. G. (2017). Population Biology of Plant Pathogens: Genetics, Ecology, and Evolution. En *General Plant Pathology*. The American Phytopathological Society. <https://doi.org/doi:10.1094/9780890544525>
- Miranda, L. M., y Garzón, L. N. (2021). Morfología del agente causal de la mancha anillada (*Boeremia* spp.). En L. N. Garzón, G. A. Ligarreto, Y. Miranda, C. C. Pimentel, y J. E. Sepúlveda (Eds.), *La mancha anillada en el cultivo de frijol* (1st ed., pp. 36–44). Publicaciones UIS.

- Miranda, Y. (2018). *Distribución e intensidad de la mancha anillada del frijol* [Tesis de pregrado]. Universidad Industrial de Santander.
- Mkandawire, A. B. C., Mabagala, R. B., Pablo Guzmán, Gepts, P., y Gilbertson, R. L. (2004). Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology*, 94(6), 593–603.
- Müller, B. S. F., Pappas, G. J., Valdisser, P. A. M. R., Coelho, G. R. C., de Menezes, I. P. P., Abreu, A. G., Borba, T. C. O., Sakamoto, T., Brondani, C., Barros, E. G., y Vianello, R. P. (2015). An operational SNP panel integrated to SSR Marker for the Assessment of Genetic Diversity and Population Structure of the Common Bean. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33(6), 1697–1711. <https://doi.org/10.1007/s11105-015-0866-x>
- Narum, S. R., Buerkle, C. A., Davey, J. W., Miller, M. R., y Hohenlohe, P. A. (2013). Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 2841–2847. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/mec.12350>
- Nei, M. (1978). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Nevo, E. (2001). Genetic Diversity. En S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity* (2a ed., Vol. 3, pp. 662–677). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00065-4>
- Ospina-Parra, C. E., Medrano, J. C. M., Contreras Valencia, K., y Tautiva Merchan, L. A. (2020). Análisis socioeconómico del cultivo de fríjol en Cundinamarca (Colombia), para la identificación de un Sistema Agroalimentario Localizado (SIAL). *Revista RIVAR*, 7(21), 13–32. <https://doi.org/10.35588/rivar.v7i21.4622>

- Pastor-Corrales M. (1985). Enfermedades del frijol causadas por hongos. En M. López, F. Fernández, y A. van. Schoonhover (Eds.), *Frijol: Investigación y producción* (pp. 169–204). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Pastor-Corrales, M. A., y Schwartz, H. F. (1994). *Problemas de producción del frijol en los trópicos*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Pastorino, M. J., y Marchelli, P. (2021). Genetic Resources: The Base Material for Managing Nature. En *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821139-7.00192-6>
- Peralta, E., Murillo, Á., Mazón, N., Rodríguez, D., y Vega, L. (2016). *Manual para el reconocimiento y control de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo del frijol (Phaseolus vulgaris L.) en Ecuador* (2a ed.). Estación Experimental Santa Catalina.
- Petro, D. (2021). Consumamos frijol en la mesa de los colombianos. *El Cerealista - Federación Nacional de Cultivadores de Cereales Leguminosas y Soya [FENALCE]*, 44–46.
- Pielou, E. C. (1975). *Ecological diversity*. John Wiley and Sons.
- R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.R-project.org/>
- Rentería, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En L. E. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular* (1st ed.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Ríos, E., Mejía-Ruiz, H., y Álvarez-Castañeda, S. T. (2009). Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. *Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 60(3), 5–13.
- Rocha, P. J. (2003). Molecular Markers, an Useful Tool for Genetic Selection in Oil Palm. *Palmas*, 24(2), 11–25.

- Schmit, V., y Baudoin, J. P. (1992). Screening for resistance to Ascochyta blight in populations of *Phaseolus coccineus* L. and *P. polyanthus* Greenman. *Field Crops Research*, 30(1–2), 155–165.
- Schoonhoven, A. van, y Pastor-Corrales, M. A. (1987). *Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm*. Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Schwartz, H. F., Correa, F., Pineda, P., Otoya, M. M., y Katherman, M. (1981). Dry Bean Yield Losses Caused by Ascochyta, Angular, and White Leaf Spots in Colombia. *Plant Disease*, 65(6), 494.
- Schwartz, H. F., Correa-Victoria, F. J., Ospina, H. F., y Flor-Montoya, C. A. (1982). *La mancha angular del fríjol y su control*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Sepúlveda, J. (2018). *Estandarización de Marcadores Moleculares para la Identificación Taxonómica del Agente Causal de la Mancha Anillada en Cultivos de Fríjol en Colombia* [Tesis de pregrado]. Universidad Industrial de Santander.
- Shannon, C. E., y Weaver, W. (1963). *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press.
- Simpson, E. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688. <https://doi.org/10.1038/163688a0>
- Sirrolli, H., Drewes, S. I., Picca, P. I., y Kalesnik, F. A. (2015). In situ conservation of the wild relative of the common bean (*Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*) at the south of its neotropical distribution: environmental characterization of a population in central Argentina. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(1), 115–129. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0139-9>

- Slatkin, M. (2017). Gene Flow and Population Structure. En L. Real (Ed.), *Ecological Genetics* (pp. 1–17). Princeton University Press.
<https://doi.org/10.1515/9781400887262-003>
- Smith, J. M., Smith, N. H., O'Rourke, M., y Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), 4384–4388.
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.10.4384>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stoddart, J. A., y Taylor, J. F. (1988). Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics*, 118(4), 705–711. <https://doi.org/10.1093/genetics/118.4.705>
- Tabima, J. F., Gonen, L., Gómez-Gallego, M., Panda, P., Grünwald, N. J., Hansen, E. M., McDougal, R., LeBoldus, J. M., y Williams, N. M. (2021). Molecular Phylogenomics and Population Structure of *Phytophthora pluvialis*. *Phytopathology*®, 111(1), 108–115.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0232-FI>
- Tabima, J. F., Söndreli, K. L., Keriö, S., Feau, N., Sakalidis, M. L., Hamelin, R. C., y LeBoldus, J. M. (2020). Population Genomic Analyses Reveal Connectivity via Human-Mediated Transport across *Populus* Plantations in North America and an Undescribed Subpopulation of *Sphaerulina musiva*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 33(2), 189–199.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-05-19-0131-R>
- Tamayo, P. J. (1995). *Manejo y control de las enfermedades del frijol voluble (Phaseolus vulgaris L.)*.

- Tavare, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. En R. M. Miura (Ed.), *Some Mathematical Questions in Biology - DNA Sequence Analysis* (pp. 57–86). Amer Math Soc.
- Taylor, J. W., Hann-Soden, C., Branco, S., Sylvain, I., y Ellison, C. E. (2015). Clonal reproduction in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(29), 8901–8908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503159112>
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., y Fisher, M. C. (1999). THE EVOLUTION OF ASEXUAL FUNGI: Reproduction, Speciation and Classification. *Annual Review of Phytopathology*, *37*(1), 197–246. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.197>
- Tello, D., Gonzalez-Garcia, L. N., Gomez, J., Zuluaga-Monares, J. C., Garcia, R., Angel, R., Mahecha, D., Duarte, E., Leon, M. del R., Reyes, F., Escobar-Velásquez, C., Linares-Vásquez, M., Cardozo, N., y Duitama, J. (2023). NGSEP 4: Efficient and accurate identification of orthogroups and whole-genome alignment. *Molecular Ecology Resources*, *23*(3), 712–724. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1755-0998.13737>
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *181*(1), 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Tibayrenc, M., y Ayala, F. J. (2012). Reproductive clonality of pathogens: A perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(48), E3305–E3313. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212452109>
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenière, S. F., Dardé, M. L., y Ayala, F. J. (1991). Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 88(12), 5129–5133.
<https://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5129>

Ulloa, J. A., Rosas, P., Ramírez, J. C., y Ulloa, B. E. (2011). El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*, 8(3).

Urbina, R. (2018). *Control de Calidad en la Producción “Tradicional” y “No convencional” de Semilla de Fríjol (Phaseolus vulgaris L.)*.

van Lint, J. H. (1998). *Introduction to Coding Theory* (3a ed., Vol. 1). Springer.

Varón, A. (2016, agosto 19). *Llegó la hora de hablar de frijol en Colombia*.
<https://blog.ciat.cgiar.org/es/llego-la-hora-de-hablar-de-frijol-en-colombia/>.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
<https://ggplot2.tidyverse.org>

Winter, D. J. (2012). mmod: an R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources*, 12(6), 1158–1160.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x>

Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., y Lam, T. T.-Y. (2017). ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 28–36.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>

Zhan, J., Pettway, R. E., y McDonald, B. A. (2003). The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology*, 38(3), 286–297. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00538-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00538-8)

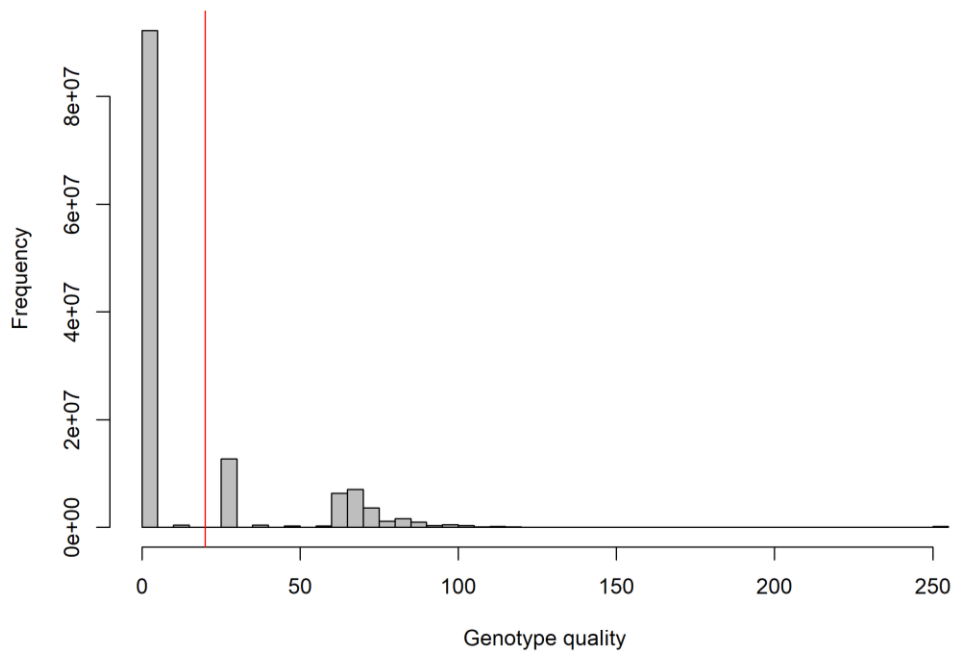
APÉNDICES

Apéndice A. Aislamientos de *B. noackiana* utilizados en el llamado inicial de variantes SNP's.

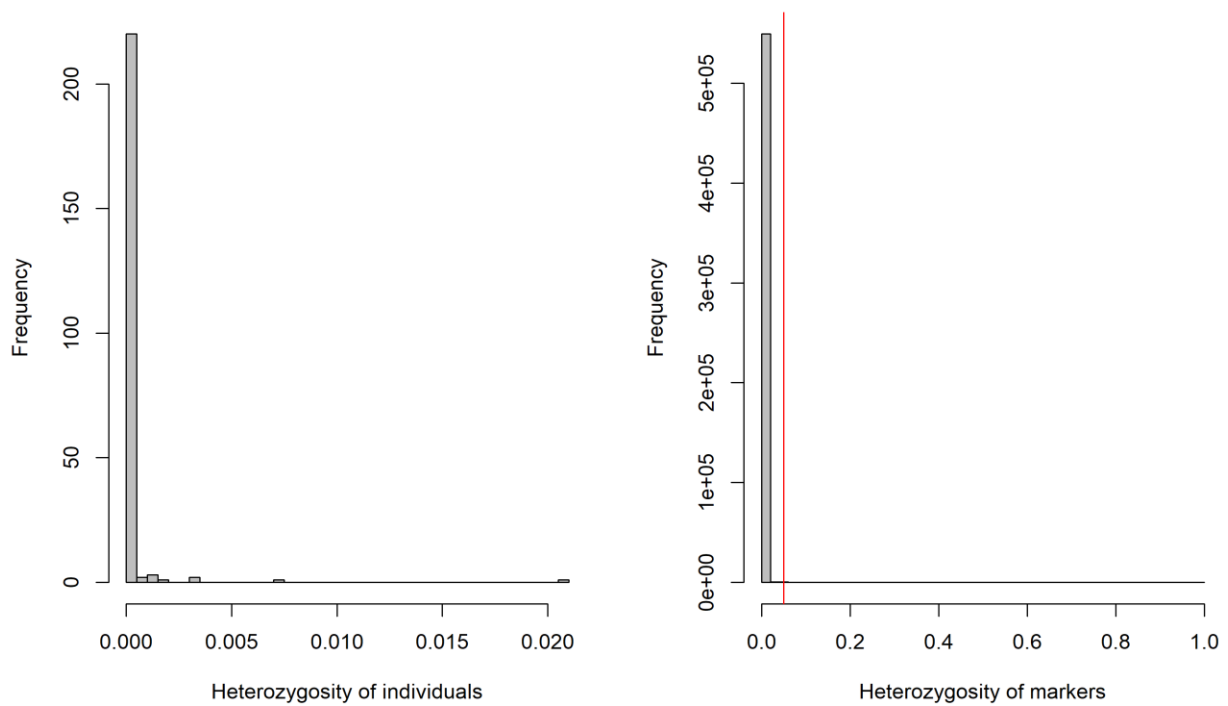
Muestra	Departamento	Muestra	Departamento	Muestra	Departamento
Boer_001	Cauca	Boer_083	Cundinamarca	Boer_219	Boyacá
Boer_003	Antioquia	Boer_085	Cundinamarca	Boer_221	Boyacá
Boer_004	Antioquia	Boer_086	Cundinamarca	Boer_222	Boyacá
Boer_006	Antioquia	Boer_087	Cundinamarca	Boer_226	Boyacá
Boer_007	Antioquia	Boer_088	Cundinamarca	Boer_229	Boyacá
Boer_012	Valle del Cauca	Boer_092	Cundinamarca	Boer_230	Boyacá
Boer_013	Cauca	Boer_096	Cundinamarca	Boer_231	Boyacá
Boer_014	Cauca	Boer_098	Cundinamarca	Boer_232	Boyacá
Boer_015	Cauca	Boer_102	Cundinamarca	Boer_236	Santander
Boer_016	Cauca	Boer_106	Cundinamarca	Boer_237	Santander
Boer_017	Cundinamarca	Boer_111	Cundinamarca	Boer_238	Boyacá
Boer_018	Cundinamarca	Boer_114	Cundinamarca	Boer_239	Boyacá
Boer_019	Cundinamarca	Boer_118	Cundinamarca	Boer_240	Boyacá
Boer_020	Cundinamarca	Boer_129	Cundinamarca	Boer_241	Valle del Cauca
Boer_029	Cundinamarca	Boer_137	Valle del Cauca	Boer_242	Valle del Cauca
Boer_030	Cundinamarca	Boer_138	Valle del Cauca	Boer_244	Cauca
Boer_031	Cundinamarca	Boer_140	Valle del Cauca	Boer_253	Antioquia
Boer_032	Cundinamarca	Boer_141	Valle del Cauca	Boer_256	Cauca
Boer_037	Cundinamarca	Boer_149	Valle del Cauca	Boer_257	Antioquia
Boer_038	Cundinamarca	Boer_165	Cundinamarca	Boer_258	Antioquia
Boer_039	Cundinamarca	Boer_169	Valle del Cauca	Boer_259	Antioquia
Boer_040	Cundinamarca	Boer_170	Valle del Cauca	Boer_260	Antioquia
Boer_045	Cundinamarca	Boer_171	Valle del Cauca	Boer_261	Antioquia
Boer_046	Cundinamarca	Boer_172	Valle del Cauca	Boer_262	Antioquia
Boer_047	Cundinamarca	Boer_173	Valle del Cauca	Boer_270	Cauca
Boer_048	Cundinamarca	Boer_178	Cauca	Boer_271	Cauca
Boer_053	Cundinamarca	Boer_186	Cauca	Boer_272	Santander
Boer_054	Cundinamarca	Boer_191	Cundinamarca	Boer_273	Santander
Boer_055	Cundinamarca	Boer_193	Cundinamarca	Boer_291	Antioquia
Boer_056	Cundinamarca	Boer_198	Cundinamarca	Boer_292	Antioquia
Boer_062	Cundinamarca	Boer_205	Cundinamarca	Boer_293	Antioquia
Boer_067	Cundinamarca	Boer_206	Cundinamarca	Boer_294	Antioquia
Boer_071	Cundinamarca	Boer_209	Boyacá	Boer_297	Antioquia
Boer_076	Cundinamarca	Boer_211	Boyacá	Boer_300	Antioquia
Boer_080	Cundinamarca	Boer_213	Boyacá	Boer_302	Antioquia

Muestra	Departamento	Muestra	Departamento	Muestra	Departamento
Boer_081	Cundinamarca	Boer_215	Boyacá	Boer_307	Antioquia
Boer_082	Cundinamarca	Boer_217	Boyacá	Boer_308	Antioquia
Boer_310	Antioquia	Boer_427	Tolima	Boer_520	Huila
Boer_311	Antioquia	Boer_428	Tolima	Boer_523	Huila
Boer_312	Antioquia	Boer_432	Tolima	Boer_525	Huila
Boer_313	Antioquia	Boer_433	Tolima	Boer_529	Huila
Boer_317	Antioquia	Boer_437	Tolima	Boer_535	Huila
Boer_329	Antioquia	Boer_441	Tolima	Boer_538	Huila
Boer_336	Antioquia	Boer_446	Tolima	Boer_539	Huila
Boer_345	Antioquia	Boer_450	Tolima	Boer_540	Huila
Boer_347	Antioquia	Boer_451	Tolima	Boer_541	Huila
Boer_351	Antioquia	Boer_452	Tolima	Boer_544	Huila
Boer_352	Antioquia	Boer_453	Tolima	Boer_549	Huila
Boer_353	Antioquia	Boer_457	Tolima	Boer_553	Huila
Boer_354	Antioquia	Boer_460	Tolima	Boer_560	Huila
Boer_357	Antioquia	Boer_461	Tolima	Boer_565	Huila
Boer_361	Antioquia	Boer_468	Tolima	Boer_571	Huila
Boer_365	Antioquia	Boer_472	Tolima	Boer_572	Huila
Boer_366	Antioquia	Boer_475	Tolima	Boer_574	Huila
Boer_367	Antioquia	Boer_476	Tolima	Boer_575	Huila
Boer_368	Antioquia	Boer_477	Tolima	Boer_576	Huila
Boer_370	Antioquia	Boer_478	Tolima	Boer_577	Huila
Boer_374	Antioquia	Boer_479	Tolima	Boer_580	Huila
Boer_375	Antioquia	Boer_483	Tolima	Boer_581	Huila
Boer_376	Antioquia	Boer_485	Tolima	Boer_582	Huila
Boer_377	Antioquia	Boer_487	Tolima	Boer_586	Huila
Boer_380	Antioquia	Boer_488	Tolima	Boer_587	Huila
Boer_387	Antioquia	Boer_489	Tolima	Boer_590	Huila
Boer_392	Antioquia	Boer_490	Tolima	Boer_593	Huila
Boer_401	Antioquia	Boer_493	Tolima	Boer_595	Huila
Boer_407	Antioquia	Boer_497	Tolima	Boer_596	Huila
Boer_412	Antioquia	Boer_500	Tolima	Boer_602	Huila
Boer_414	Tolima	Boer_504	Tolima	Boer_603	Huila
Boer_415	Tolima	Boer_508	Tolima	Boer_604	Huila
Boer_416	Tolima	Boer_510	Tolima	Boer_606	Huila
Boer_417	Tolima	Boer_513	Huila	Boer_607	Huila
Boer_419	Tolima	Boer_514	Huila	Boer_609	Huila
Boer_422	Tolima	Boer_515	Huila	Boer_614	Huila
Boer_425	Tolima	Boer_516	Huila	Boer_617	Huila
Boer_426	Tolima	Boer_517	Huila		

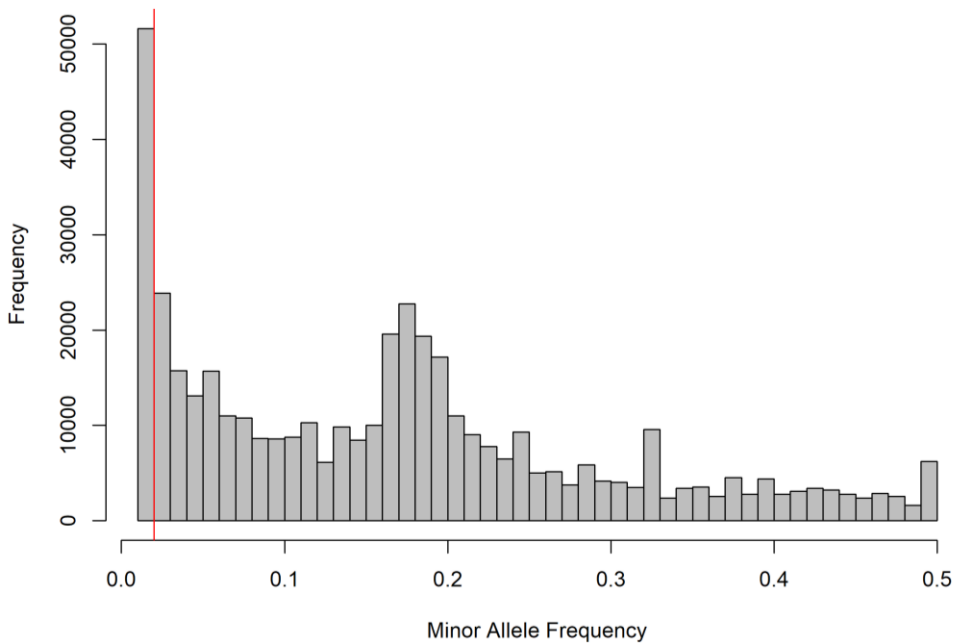
Apéndice B. Calidad de genotipos versus frecuencia de variantes SNP



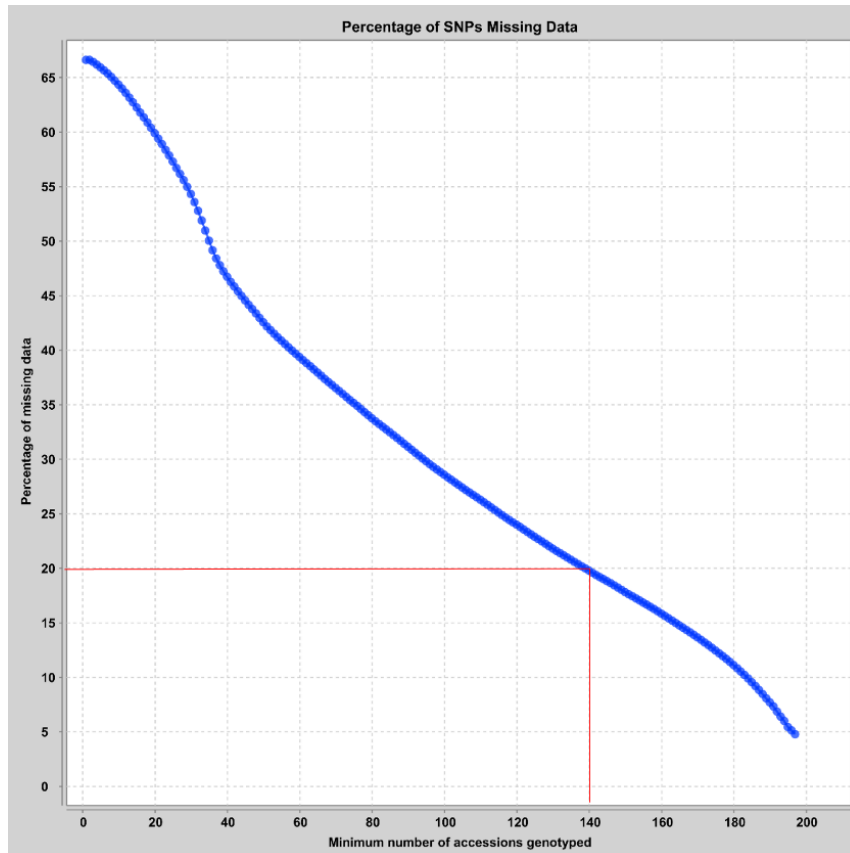
Apéndice C. Heterocigosidad en individuos y en variantes SNP



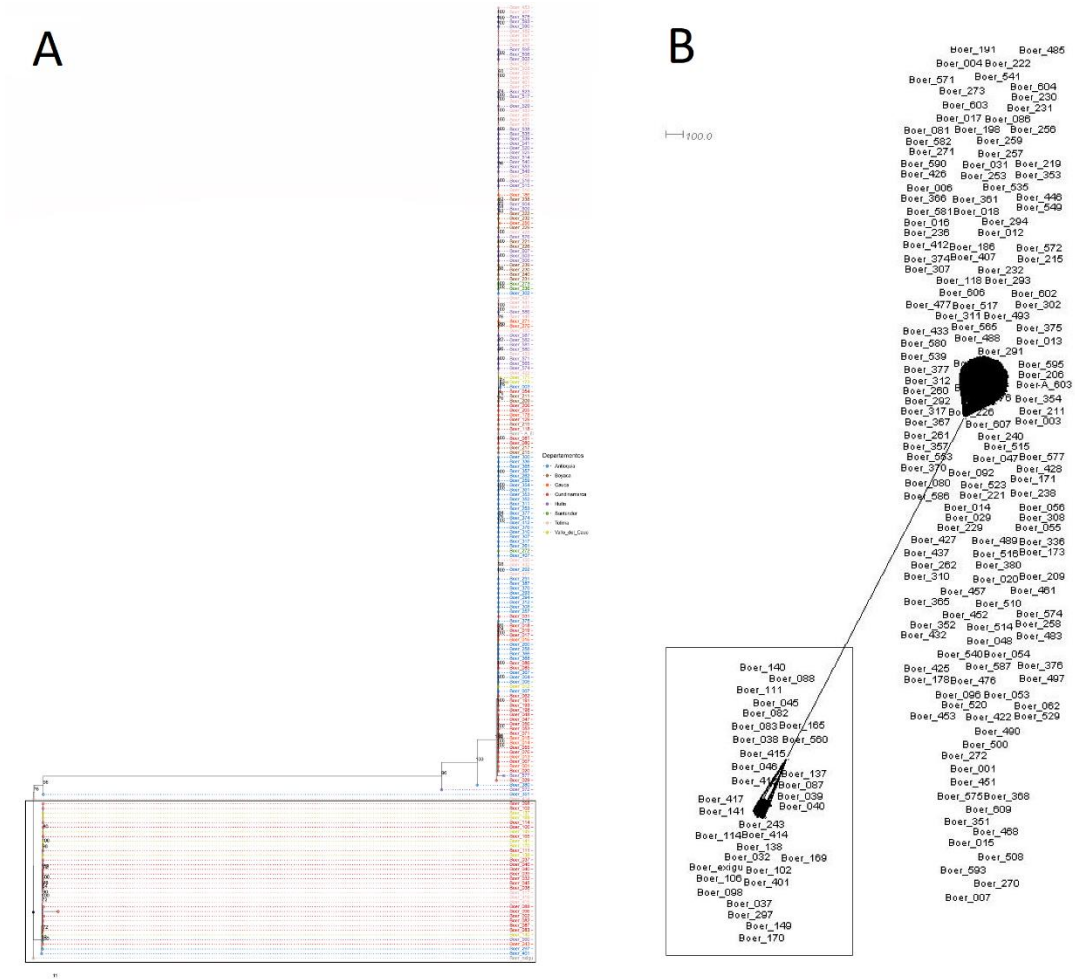
Apéndice D. Frecuencia de alelo menor versus frecuencia de variantes SNP



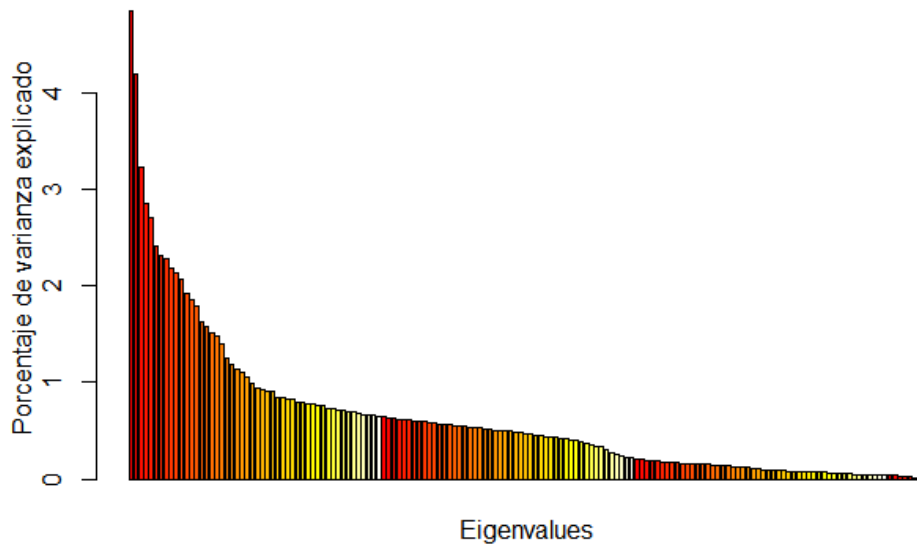
Apéndice E. Porcentaje de datos perdidos según el número mínimo de variantes genotipadas



Apéndice F. Muestras emparentadas con *Boeremia exigua*. (A) Árbol de ML. (B) MSN.

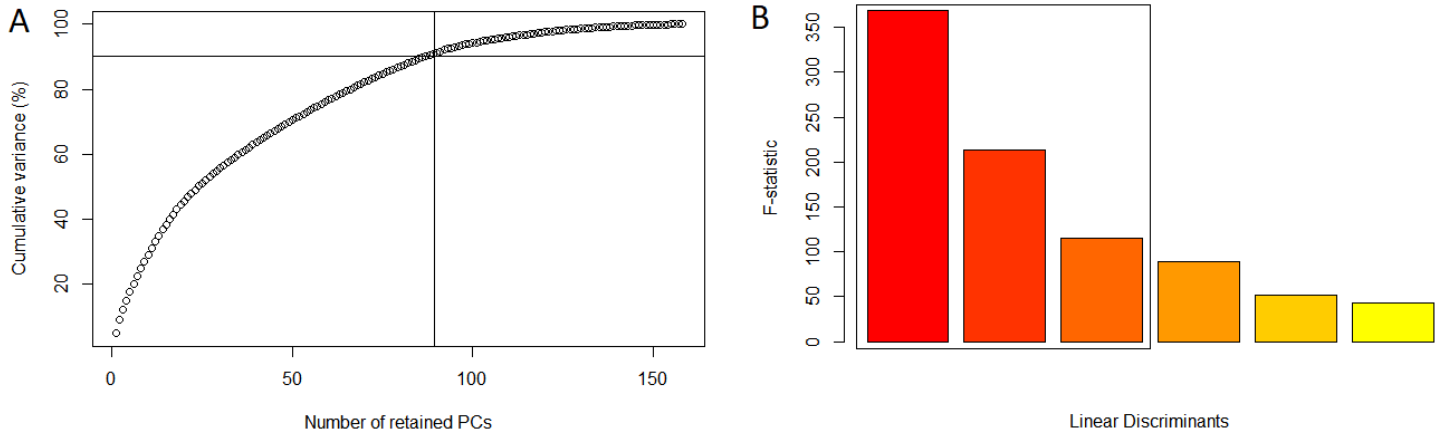


Apéndice G. Porcentaje de varianza explicado por los componente principal del ACP.



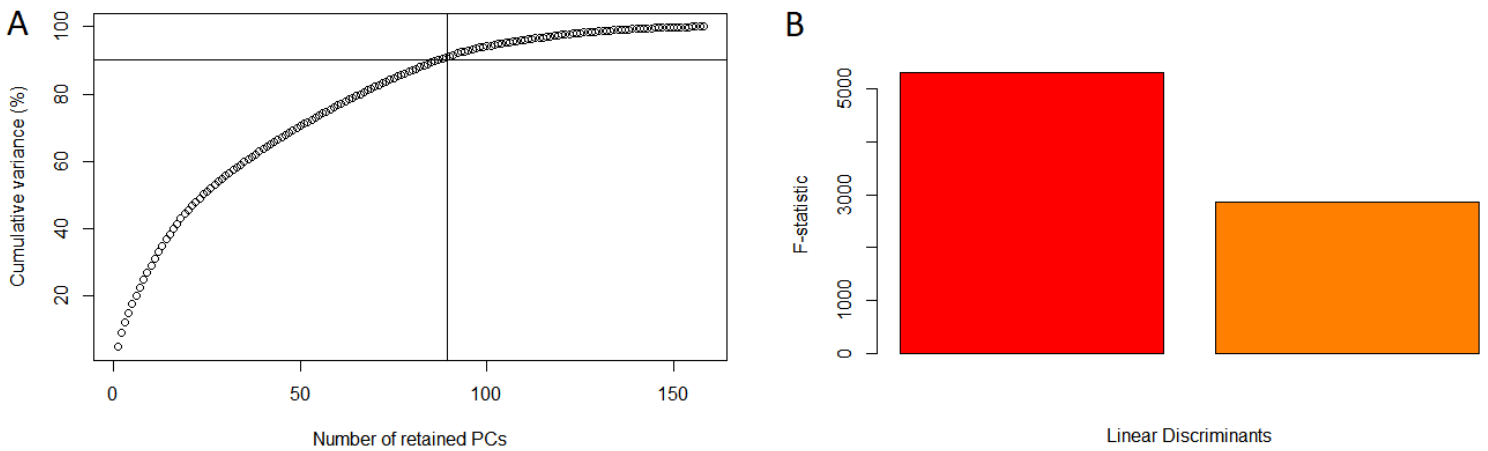
Apéndice H. Criterios del DAPC realizados con los departamentos seleccionados *a priori*. (A)

Varianza según los componentes principales; (B) Varianza según los componentes discriminantes.



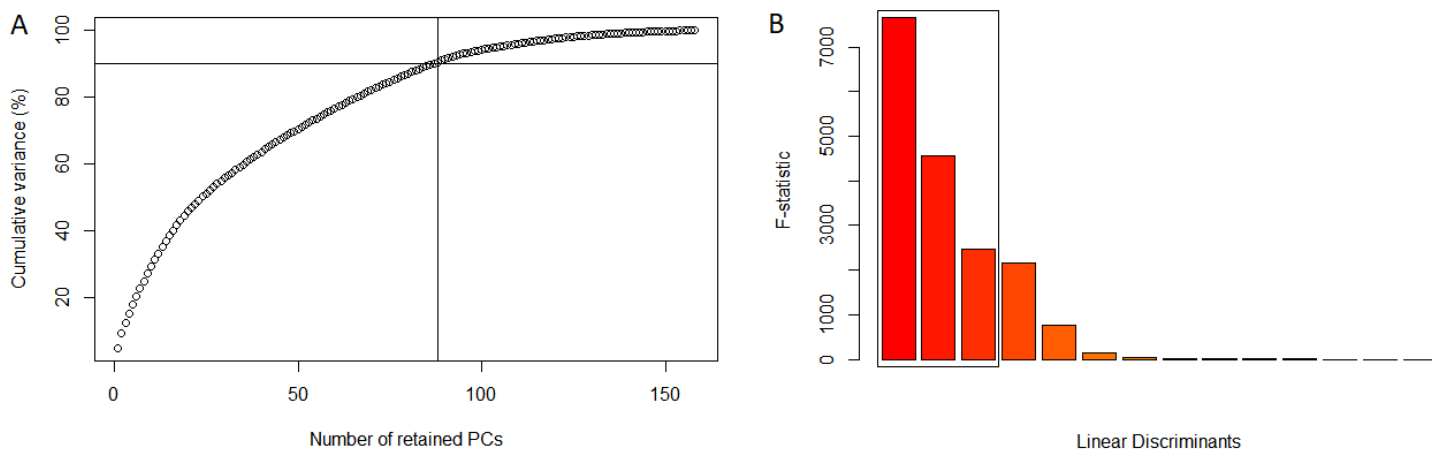
Apéndice I. Criterios del DAPC de agrupaciones genética. (A) Varianza según los componentes

principales; (B) Varianza según los componentes discriminantes.



Apéndice J. Criterios del DAPC realizados con variedades de frijol seleccionadas *a priori*. (A)

Varianza según los componentes principales; (B) Varianza según los componentes discriminantes.



Apéndice K. Variedades de frijol hospederas de las muestras de *Boeremia noackiana*.

Muestra	Departamento	Variedad
Boer_004	Antioquia	Cargamanto
Boer_006	Antioquia	Cargamanto
Boer_007	Antioquia	Cargamanto
Boer_013	Cauca	AFR 612
Boer_014	Cauca	DOOR 500
Boer_015	Cauca	ASC 75
Boer_016	Cauca	ICTA HUMAPU
Boer_017	Cundinamarca	Cargamanto
Boer_018	Cundinamarca	Cargamanto
Boer_019	Cundinamarca	Cargamanto
Boer_020	Cundinamarca	Cargamanto
Boer_031	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_047	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_048	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_053	Cundinamarca	Habichuela
Boer_055	Cundinamarca	Habichuela
Boer_056	Cundinamarca	Habichuela
Boer_062	Cundinamarca	Cargamanto Rojo
Boer_215	Boyacá	Bola Roja

Muestra	Departamento	Variedad
Boer_067	Cundinamarca	Habichuela
Boer_071	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_076	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_080	Cundinamarca	Habichuela
Boer_081	Cundinamarca	Habichuela
Boer_085	Cundinamarca	Habichuela
Boer_086	Cundinamarca	Habichuela
Boer_118	Cundinamarca	Habichuela
Boer_129	Cundinamarca	Habichuela
Boer_178	Cauca	G 50468-A
Boer_186	Cauca	G 16915
Boer_191	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_193	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_198	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_205	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_206	Cundinamarca	Bola Roja
Boer_209	Boyacá	Bola Roja
Boer_211	Boyacá	Bola Roja
Boer_367	Antioquia	Cargamanto Rojo

Muestra	Departamento	Variedad
Boer_217	Boyacá	Bola Roja
Boer_219	Boyacá	Bola Roja
Boer_221	Boyacá	Bola Roja
Boer_222	Boyacá	Bola Roja
Boer_226	Boyacá	Bola Roja
Boer_229	Boyacá	Bola Roja
Boer_230	Boyacá	Bola Roja
Boer_231	Boyacá	Bola Roja
Boer_232	Boyacá	Bola Roja
Boer_253	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_256	Cauca	NCB 744
Boer_257	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_258	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_259	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_260	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_261	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_262	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_291	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_292	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_293	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_294	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_300	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_302	Antioquia	MRC8
Boer_307	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_308	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_310	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_311	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_312	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_317	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_336	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_352	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_353	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_354	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_357	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_361	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_365	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_366	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_508	Tolima	Cargamanto

Muestra	Departamento	Variedad
Boer_368	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_370	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_374	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_375	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_376	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_377	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_387	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_407	Antioquia	Cargamanto Rojo
Boer_412	Antioquia	Cargamanto Blanco
Boer_422	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_425	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_426	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_427	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_428	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_432	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_433	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_437	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_441	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_446	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_450	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_451	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_452	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_453	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_457	Tolima	Cargamanto Rojo
Boer_461	Tolima	Guarzo Rojo
Boer_468	Tolima	Guarzo Rojo
Boer_476	Tolima	Bola Roja
Boer_477	Tolima	Bola Roja
Boer_483	Tolima	Bola Roja
Boer_485	Tolima	Bola Roja
Boer_487	Tolima	Habichuela
Boer_488	Tolima	Habichuela
Boer_489	Tolima	Habichuela
Boer_490	Tolima	Habichuela
Boer_493	Tolima	Habichuela
Boer_497	Tolima	Habichuela
Boer_500	Tolima	Cargamanto
Boer_574	Huila	Bola Roja

Muestra	Departamento	Variedad
Boer_510	Tolima	Cargamanto
Boer_514	Huila	Calima
Boer_515	Huila	Calima
Boer_516	Huila	Calima
Boer_517	Huila	Calima
Boer_520	Huila	Cargamanto Rojo
Boer_523	Huila	Cargamanto
Boer_525	Huila	Habichuela
Boer_529	Huila	Cargamanto Rojo
Boer_535	Huila	Cargamanto Rojo
Boer_538	Huila	Bola Roja
Boer_539	Huila	Bola Roja
Boer_540	Huila	Bola Roja
Boer_541	Huila	Bola Roja
Boer_549	Huila	Cargamanto Rojo
Boer_553	Huila	Bola Roja
Boer_565	Huila	Bola Roja
Boer_571	Huila	Bola Roja

Muestra	Departamento	Variedad
Boer_575	Huila	Bola Roja
Boer_576	Huila	Bola Roja
Boer_580	Huila	Bola Roja
Boer_581	Huila	Bola Roja
Boer_582	Huila	Bola Roja
Boer_586	Huila	Cargamanto Blanco
Boer_587	Huila	Cargamanto
Boer_590	Huila	Bola Roja
Boer_593	Huila	Bola Roja
Boer_595	Huila	Bola Roja
Boer_596	Huila	Bola Roja
Boer_602	Huila	Cargamanto Blanco
Boer_603	Huila	Cargamanto Blanco
Boer_604	Huila	Cargamanto Blanco
Boer_606	Huila	Cargamanto Blanco
Boer_607	Huila	Cargamanto Blanco
Boer_609	Huila	Cargamanto Blanco
Boer_614	Huila	Cargamanto Blanco

Apéndice L. Aislamientos de *B. noackiana* del VCF final y utilizados en los análisis.

Muestra	Departamento
Boer_001	Cauca
Boer_004	Antioquia
Boer_006	Antioquia
Boer_007	Antioquia
Boer_013	Cauca
Boer_014	Cauca
Boer_015	Cauca
Boer_016	Cauca
Boer_017	Cundinamarca
Boer_018	Cundinamarca
Boer_019	Cundinamarca
Boer_020	Cundinamarca
Boer_031	Cundinamarca
Boer_047	Cundinamarca
Boer_048	Cundinamarca
Boer_053	Cundinamarca
Boer_055	Cundinamarca

Muestra	Departamento
Boer_076	Cundinamarca
Boer_080	Cundinamarca
Boer_081	Cundinamarca
Boer_085	Cundinamarca
Boer_086	Cundinamarca
Boer_118	Cundinamarca
Boer_129	Cundinamarca
Boer_178	Cauca
Boer_186	Cauca
Boer_191	Cundinamarca
Boer_193	Cundinamarca
Boer_198	Cundinamarca
Boer_205	Cundinamarca
Boer_206	Cundinamarca
Boer_209	Boyacá
Boer_211	Boyacá
Boer_215	Boyacá

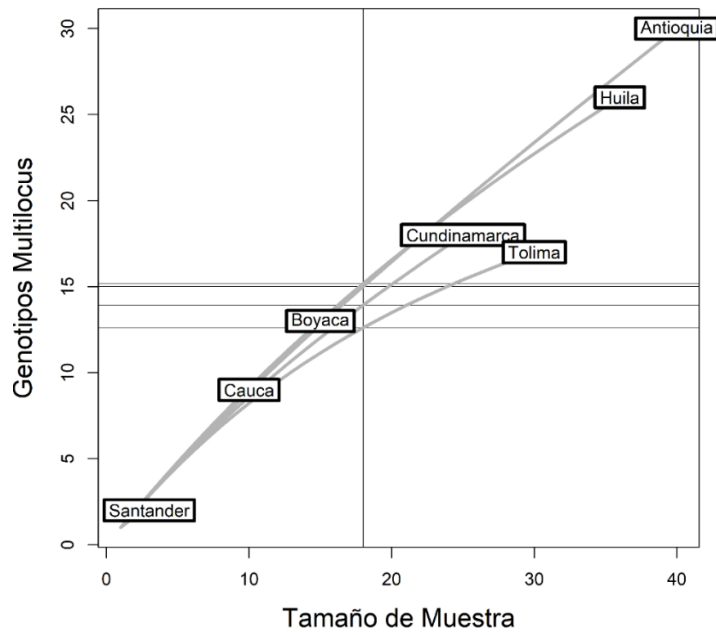
Muestra	Departamento
Boer_226	Boyacá
Boer_229	Boyacá
Boer_230	Boyacá
Boer_231	Boyacá
Boer_232	Boyacá
Boer_236	Santander
Boer_238	Boyacá
Boer_239	Boyacá
Boer_240	Boyacá
Boer_253	Antioquia
Boer_256	Cauca
Boer_257	Antioquia
Boer_258	Antioquia
Boer_259	Antioquia
Boer_260	Antioquia
Boer_261	Antioquia
Boer_262	Antioquia

Muestra	Departamento
Boer_056	Cundinamarca
Boer_062	Cundinamarca
Boer_067	Cundinamarca
Boer_071	Cundinamarca
Boer_291	Antioquia
Boer_292	Antioquia
Boer_293	Antioquia
Boer_294	Antioquia
Boer_300	Antioquia
Boer_302	Antioquia
Boer_307	Antioquia
Boer_308	Antioquia
Boer_310	Antioquia
Boer_311	Antioquia
Boer_312	Antioquia
Boer_317	Antioquia
Boer_336	Antioquia
Boer_352	Antioquia
Boer_353	Antioquia
Boer_354	Antioquia
Boer_357	Antioquia
Boer_361	Antioquia
Boer_365	Antioquia
Boer_366	Antioquia
Boer_367	Antioquia
Boer_368	Antioquia
Boer_370	Antioquia
Boer_374	Antioquia
Boer_375	Antioquia
Boer_376	Antioquia
Boer_377	Antioquia
Boer_387	Antioquia
Boer_407	Antioquia
Boer_412	Antioquia
Boer_422	Tolima
Boer_425	Tolima

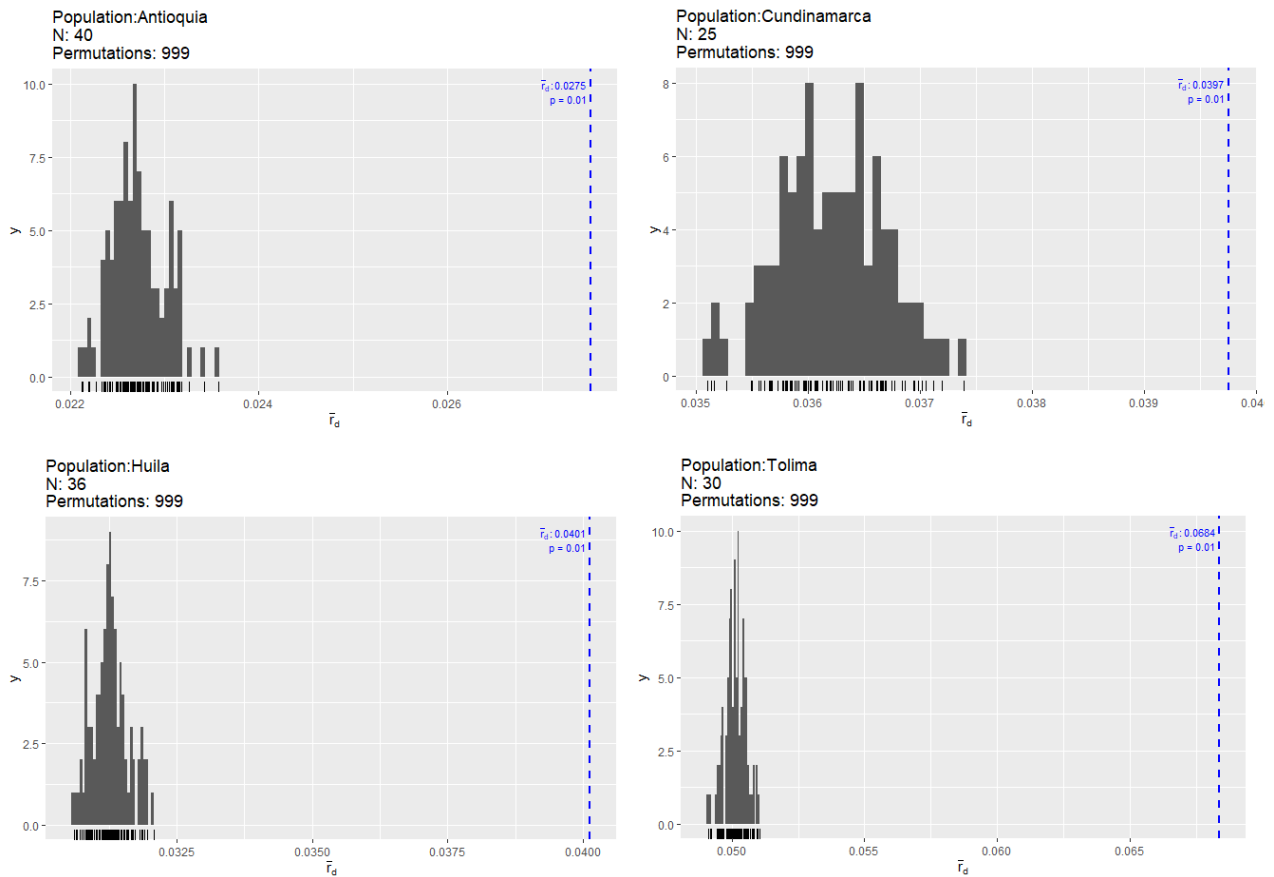
Muestra	Departamento
Boer_217	Boyacá
Boer_219	Boyacá
Boer_221	Boyacá
Boer_222	Boyacá
Boer_426	Tolima
Boer_427	Tolima
Boer_428	Tolima
Boer_432	Tolima
Boer_433	Tolima
Boer_437	Tolima
Boer_441	Tolima
Boer_446	Tolima
Boer_450	Tolima
Boer_451	Tolima
Boer_452	Tolima
Boer_453	Tolima
Boer_457	Tolima
Boer_461	Tolima
Boer_468	Tolima
Boer_476	Tolima
Boer_477	Tolima
Boer_483	Tolima
Boer_485	Tolima
Boer_487	Tolima
Boer_488	Tolima
Boer_489	Tolima
Boer_490	Tolima
Boer_493	Tolima
Boer_497	Tolima
Boer_500	Tolima
Boer_508	Tolima
Boer_510	Tolima
Boer_514	Huila
Boer_515	Huila
Boer_516	Huila
Boer_517	Huila

Muestra	Departamento
Boer_270	Cauca
Boer_271	Cauca
Boer_272	Santander
Boer_273	Santander
Boer_520	Huila
Boer_523	Huila
Boer_525	Huila
Boer_529	Huila
Boer_535	Huila
Boer_538	Huila
Boer_539	Huila
Boer_540	Huila
Boer_541	Huila
Boer_549	Huila
Boer_553	Huila
Boer_565	Huila
Boer_571	Huila
Boer_574	Huila
Boer_575	Huila
Boer_576	Huila
Boer_580	Huila
Boer_581	Huila
Boer_582	Huila
Boer_586	Huila
Boer_587	Huila
Boer_590	Huila
Boer_593	Huila
Boer_595	Huila
Boer_596	Huila
Boer_602	Huila
Boer_603	Huila
Boer_604	Huila
Boer_606	Huila
Boer_607	Huila
Boer_609	Huila
Boer_614	Huila

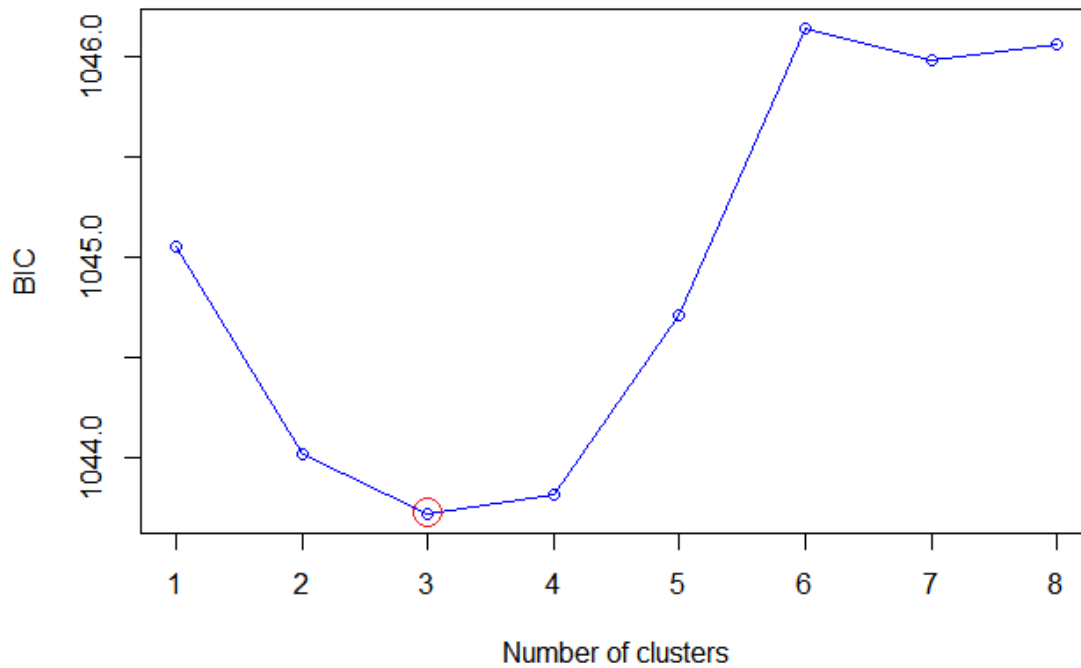
Apéndice M. Curva de rarefacción para análisis de genotipos multilocus de los departamentos



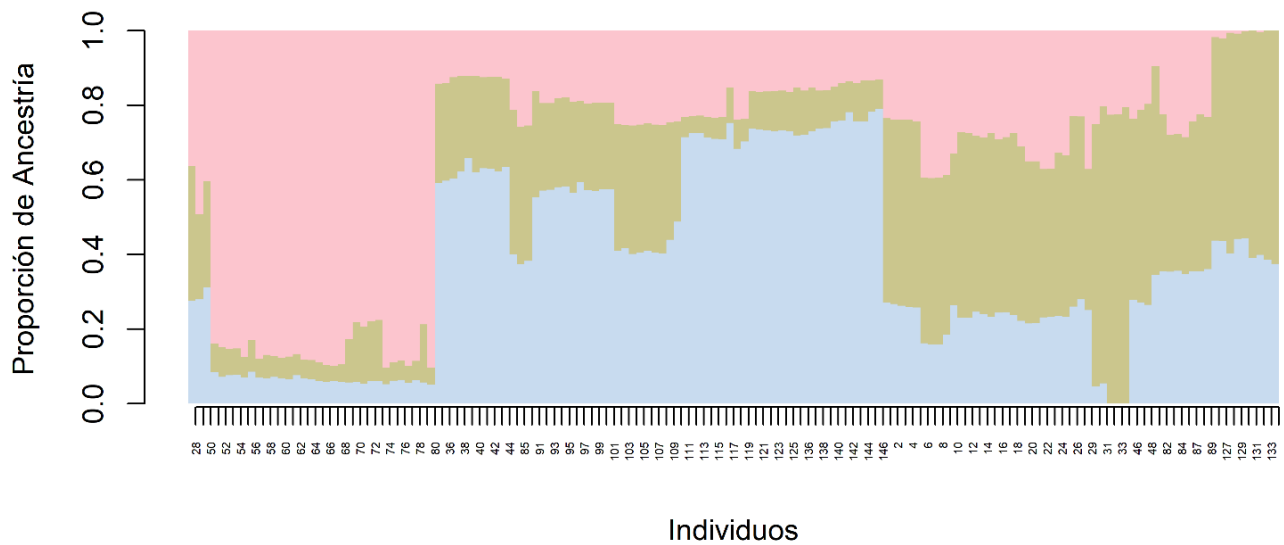
Apéndice N. Índice estandarizado de asociación de los departamentos.



Apéndice O. Valor de BIC versus número de agrupaciones genéticas escogidas



Apéndice P. Matriz de co-ascendencia de las muestras para k= 3 poblaciones ancestrales



Apéndice Q. DAPC realizado con variedades de frijol seleccionadas como grupos *a priori*. (A) Gráfico de dispersión, (B) Probabilidad posterior de cada muestra de pertenecer a una variedad.

