

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *Phytophthora infestans*
(Mont.) de Bary OBTENIDAS DE DIFERENTES ESPECIES DE SOLANÁCEAS
CULTIVADAS EN LAS ZONAS PRODUCTORAS DE NARIÑO Y PUTUMAYO.

MARÍA FERNANDA MIDEROS BASTIDAS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2008

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *Phytophthora infestans*
(Mont.) de Bary OBTENIDAS DE DIFERENTES ESPECIES DE SOLANÁCEAS
CULTIVADAS EN LAS ZONAS PRODUCTORAS DE NARIÑO Y PUTUMAYO.

MARÍA FERNANDA MIDEROS BASTIDAS

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

Directores

M. Sc LUZ ESTELA LAGOS MORA

cM.Sc OSCAR BURBANO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2008

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1ro del acuerdo No 324 de Octubre 11 de 1996 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Director

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Agosto de 2008

DEDICATORIA

A Dios por ser mi fuerza, por enseñarme a valorar lo que hago cada día...
al amor que hace parte de cada uno de mis sueños e ilusiones
A mis abuelos Esperanza y Lucindo, mi mamá y mi familia, la principal motivación para
luchar y llegar más allá de mis propios retos...

María Fernanda

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a:

Mi familia, mis tíos y primos por su apoyo incondicional, su colaboración y su comprensión fuera y dentro de la Universidad Muchas gracias...

La Vicerrectoria de Investigaciones, postgrados y relaciones internacionales-VIPRI de la Universidad de Nariño y el Grupo Genética de Patosistemas-GENPAT por la financiación que hizo posible la realización de este proyecto.

Mis asesores de tesis Luz Estela Lagos y Oscar Burbano por la colaboración en la realización de este documento, la formación personal, profesional y por la confianza que han depositado en mí desde que empecé mi proceso dentro del grupo.

Eliana Revelo y Gabriela Dorado integrantes del grupo de Investigación GENPAT, por su apoyo, el trabajo en equipo y los importantes aportes que realizaron en esta investigación.

Los integrantes del grupo de Biotecnología Microbiana BIOMA por su colaboración y amistad.

Un agradecimiento a Daniel Bravo, Diana Burbano, Derly Andrade Silvia Montenegro y Sandra Álvarez por compartir experiencias, conocimientos y haber hecho tan agradable el trabajo dentro del laboratorio durante la ejecución del proyecto.

La gente de la Universidad Nacional Sede Medellín, mis amigos... Jhon Alvarez, Catalina Zuluaga, Mariluz Ayala, y Victoria Mesa, quienes con su amistad y su experiencia me enseñaron a confiar en lo que hago

Rosana Pineda M.Sc. Biotecnología por sus enseñanzas, su experiencia y su amistad, no sería posible este trabajo sin todos los conocimientos en Biología Molecular que ella me transmitió durante mi estadía en Medellín.

Mauricio Sarmiento, Geógrafo de la Universidad Nacional por la colaboración, dedicación y paciencia en la realización de los mapas presentados en el documento.

Los agricultores y campesinos de Nariño y Putumayo, quienes con sus historias y su experiencia me dejaron muchas enseñanzas durante la visita a sus cultivos.

Quiero expresar un agradecimiento a mis compañeros Yulieth Castillo, Pauline Bastidas, Yuri Rosero, Elkin Noguera, Daniel Bravo, Mónica Lombana, Luis Laso, Julie Benavides y Rubén Jurado por su amistad durante estos años, por aguantarme y acompañarme en cada una de las etapas de mi carrera, por los consejos, por motivarme a seguir adelante cuando parecía imposible y por ayudarme a ser profesionalmente lo que soy en este momento Gracias!.

Y por último un agradecimiento a toda la gente de la Universidad de Nariño que hizo posible esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. MARCO TEÓRICO	22
3.1 CARACTERÍSTICAS DE <i>Phytophthora infestans</i>	22
3.2 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE <i>P. infestans</i>	23
3.2.1 Haplotipos mitocondriales en <i>P. infestans</i>	25
3.2.2 Determinación de linajes clonales.....	30
4. METODOLOGÍA	33
4.1 LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	33
4.2 COLECCIÓN DE MUESTRAS EN CAMPO	35
4.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS POBLACIONES DE <i>Phytophthora</i>	36
4.3.1 Extracción del DNA.....	36
4.3.2 Amplificación de DNA.....	36
4.3.3 Digestión con enzimas de restricción	37
4.3.4 Análisis de Haplotipos mitocondriales	37
4.3.5 Distribución de los haplotipos mitocondriales	38
4.3.6 Determinación de los linajes clonales	38
5. RESULTADOS	39

5.1 Colección de muestras y registro de cultivos evaluados en Nariño y Putumayo	39
5.2 Presencia de Phytophthora en los hospedantes evaluados.....	41
5.3 Caracterización de las poblaciones de Phytophthora a partir de PCR-RFLP	43
5.4 Determinación de los linajes clonales mediante haplotipos mitocondriales.....	50
5.5 Estructura genética del complejo Phytophthora en Nariño y Putumayo	51
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS.....	68
BIBLIOGRAFIA	69
ANEXOS	77

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tipo de apareamiento reportado para Suramérica.....	25
Tabla 2. Haplotipos y linajes clonales reportados para Suramérica.....	30
Tabla 3. Haplotipos mitocondriales y linajes clonales reportados en Colombia.....	32
Tabla 4. Primers usados para amplificación de las regiones P1, P2 y P4 en el genoma mitocondrial de <i>P. infestans</i>	37
Tabla 5. Tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos después de la digestión de la región P1, P2 y P3 con su respectiva enzima	38
Tabla 6. Localidades y hospedantes incluidos en el estudio para Nariño.....	39
Tabla 7. Localidades y hospedantes incluidos en el estudio para Putumayo	40
Tabla 8. Muestras positivas para los hospedantes incluidos en el muestreo	42
Tabla 9. Aislamientos presentes en la Colección de <i>P. infestans</i> de la Universidad de Nariño.....	43
Tabla 10. Linajes clonales encontrados para Nariño y Putumayo en diferentes especies de solanáceas mediante la determinación de haplotipos mitocondriales	51
Tabla 11. Estructura genética del complejo <i>Phytophthora</i> para Nariño y Putumayo	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación del genoma mitocondrial de <i>P. infestans</i>	26
Figura 2. Relación entre los haplotipos encontrados en <i>P. infestans</i>	28
Figura 3. Genealogía que muestra la distribución de las mutaciones dentro de los cuatro linajes mitocondriales de <i>P. infestans</i>	29
Figura 4. Localidades incluidas en el estudio consideradas las zonas más productoras de solanáceas en Putumayo	34
Figura 5. Localidades incluidas en el estudio consideradas las zonas más productoras de solanáceas en Nariño	35
Figura 6. Frecuencia de los cultivos evaluados para Nariño y Putumayo.....	41
Figura 7. Muestras positivas para Phytophthora en las variedades de papa evaluadas	44
Figura 8. Muestras positivas para Phytophthora en las variedades de tomate evaluadas	45
Figura 9. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en <i>S. tuberosum</i>	47
Figura 10. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en <i>S. phureja</i>	47
Figura 11. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en <i>S. lycopersicum</i>	48
Figura 12. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en <i>S. betaceum</i>	49
Figura 13. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en <i>S. quitoense</i>	50
Figura 14. Distribución de haplotipos de las diferentes sp. del complejo Phytophthora.....	53
Figura 15. Distribución de las diferentes especies del complejo Phytophthora	54

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Registro de localidades y cultivos incluidos en el estudio.	78
Anexo B. Variedades registradas para cada hospedante en Nariño y Putumayo.	85
Anexo C. Muestras positivas para la presencia de <i>Phytophthora</i> con su respectivo haplotipo mitocondrial y posible linaje clonal.	86
Anexo D. Hospederos evaluados en el estudio (cultivos, sintomatología y características microscópicas).....	89
Anexo E. Haplotipos mitocondriales para cada uno de los hospederos evaluados.....	101
Anexo F. Frecuencias y porcentajes de los genotipos más comunes encontrados en diferentes especies de solanáceas en los departamentos de Nariño y Putumayo.....	113
Anexo G. Mapas incluidos en el estudio donde se especifican los puntos de muestreo y el haplotipo encontrado para cada uno de ellos.....	114

GLOSARIO

Apresorio: extremo dilatado del tubo germinativo que facilita la unión y penetración en un punto de la planta.

Cenocítico: Hifas en las cuales los núcleos incluidos en un citoplasma común no están separados por tabiques que delimiten células.

Esporangioforos: Hifa de reproducción que forman los esporangios. Al abrirse los esporangios liberan numerosas esporas, cada una puede germinar y producir un nuevo micelio.

Haplotipo: Serie de polimorfismos relacionados que se heredan como una unidad, un haplotipo puede ser considerado un rasgo de ADN heredado de un linaje parental. Los haplotipos son usados frecuentemente para comparar diferentes poblaciones.

Heterotalica: Término referido a una especie constituida por individuos autoestériles (autoincompatibles), que para la reproducción sexual requieren la unión de gametos compatibles. Se refiere igualmente a una especie en la cual los sexos se presentan en talos separados, de modo que para efectuar la reproducción sexual se requieren dos talos diferentes.

Linaje clonal: Los descendientes asexuales de un genotipo dado que difieren del ancestro clonal únicamente por mutación o por recombinación mitótica y generalmente representan una gran similitud genética entre individuos

Metalaxyl: (methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate), es un fungicida fenilamida con función sistemática. Este químico es comúnmente utilizado para el control de un gran número de cultivos vegetales, principalmente contra *Phytophthora* y *Phytophthora*.

Oomycete: (Oomycota) grupo de protistas filamentosos superficialmente parecidos a hongos. El grupo engloba especies tanto saprófitas como parásitas que actúan contra animales acuáticos y plantas. Presentan características como membranas celulares compuestas de celulosa y no tienen generalmente septación.

Parasexualidad: Proceso que tiene lugar en los hongos e implica cambios en el número cromosómico, pero que difiere en lugar y tiempo del ciclo sexual. Consiste en un proceso de Heterocariosis, cariogamia, recombinación, segregación mediante entrecruzamiento mitótico y haploidización. La parasexualidad se asemeja a la reproducción sexual, mediante este proceso un organismo adquiere información genética de otro organismo, en un proceso independiente de la reproducción.

Patosistema: Subsistema dentro del sistema agrícola caracterizado por el fenómeno de parasitismo. Está constituido por un hospedante susceptible, un patógeno virulento y un ambiente predisuesto a la enfermedad.

PCR-RFLP: Siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*. Técnica que radica en el corte con endonucleasas de restricción de los productos amplificados por PCR. Si dos amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica, en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos.

RESUMEN

Dada la importancia de los cultivos de solanáceas para la región, el objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente las poblaciones de *Phytophthora infestans* obtenidas de diferentes especies de solanáceas cultivadas en Nariño y Putumayo utilizando la metodología propuesta por Griffith & Shaw (1998) para la determinación de haplotipos mitocondriales de tejidos frescos y micelio. Las muestras incluidas en el estudio fueron obtenidas durante los meses de agosto de 2007 y enero de 2008 evaluándose en total seis hospedantes: *S. tuberosum*, *S. phureja*, *S. lycopersicum*, *S. betaceum* y *S. quitoense*, los cuales representan las áreas de mayor producción de solanáceas en Nariño y Putumayo y algunos cultivos de *S. muricatum* cuya área de producción no es tan representativa. Los resultados muestran la presencia de los haplotipos mitocondriales Ia, IIa y Ib en cultivos de *S. betaceum*, *S. tuberosum* y *S. lycopersicum* respectivamente, coincidiendo con reportes y monitoreos previos realizados en la región. En el caso de *S. muricatum* pese a no ser un cultivo común fue posible encontrar muestras caracterizadas por el haplotipo mitocondrial Ib. Adicional a esta información los resultados muestran la presencia del haplotipo mitocondrial Ia en cultivos *S. lycopersicum*, siendo el primer reporte que señala la presencia de este haplotipo sobre cultivos de tomate de mesa; no obstante aun se requiere de un estudio detallado que permita determinar si existe o no adaptación del haplotipo a este hospedante. De manera particular dos poblaciones diferentes a las mencionadas fueron encontradas dentro del estudio, una de ellas asociada a *S. quitoense* y la otra asociada a *S. betaceum*, cada una con perfiles de digestión no reportados previamente para el patógeno que merecen aun ser estudiados. Por ultimo, el análisis de la distribución geográfica de estos haplotipos permitió encontrar que muchas de estas poblaciones se encuentran confluyendo de forma natural en algunas regiones de Nariño y Putumayo, ofreciendo cierta ventaja evolutiva al patógeno que puede generar graves consecuencias epidemiológicas para el control de la enfermedad en la región.

Palabras claves: *Phytophthora*, estructura genética, haplotipo mitocondrial, distribución geográfica, solanáceas.

ABSTRACT

Considering economic and social value of this crop the aim of the present study was to characterize using PCR-RFLP of mtDNA (Griffith and Shaw, 1998) the genetic structure of *P. infestans* populations from different solanaceous-crops from Nariño and Putumayo regions. Samples were obtained from growing regions since August 2007 to January 2008. Six different hosts were sampled: *S. tuberosum*, *S. phureja*, *S. lycopersicum*, *S. betaceum*, *S. quitoense* and *S. muricatum*, with clear evidence of disease occurrence. Results show a high diversity of mitochondrial haplotypes characterized by Ib mtDNA haplotype founded in *S. lycopersicum*, *S. muricatum* and presumably at *S. quitoense* (This last finding is not definitive); and IIa mtDNA haplotype founded in *S. tuberosum* y *S. phureja*, in agreement to previous local studies. Ia mtDNA haplotype from *S. betaceum*, consistent with studies in Ecuador. Also, this mitochondrial haplotype were founded in *S. lycopersicum*, being this the first report. However, it's necessary a deep research which allows to elucidate a possible specific-host adaptation. Finally, two populations sampled from *S. quitoense* and *S. betaceum*. These populations exhibit digestion profiles not previously reported. Similarly, these populations occurring together at different Nariño-Putumayo regions can to suggest the existence of a greater fitness of pathogen, which may have an effect on disease epidemiology at this region.

Key words: *Phytophthora*, genetic structure, mitochondrial haplotypes, solanáceas

1 INTRODUCCION

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary es un oomycete fitopatógeno ampliamente reconocido por ser el agente causal de una de las enfermedades más importantes y destructivas conocida mundialmente como “gota” o “tizón tardío” (Brasier, 1992). Este patógeno ataca a especies de la familia Solanaceae, encontrándose principalmente en cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y tomate de mesa (*Solanum lycopersicum* L.), entre otras solanáceas que coexisten en el mismo agroecosistema (Goodwin *et al.*, 1995; Fry & Goodwin, 1997). El impacto de la enfermedad a nivel mundial ha ocasionado serios desastres socioeconómicos destruyendo totalmente las plantaciones de estos cultivos en poco tiempo (Agrios, 2005), siendo la epidemia más conocida la famosa “Hambruna de Irlanda” registrada en el siglo XIX, donde el patógeno arrasó los cultivos de papa de este país, llevando a la muerte por inanición a más de un millón de habitantes y al desplazamiento una buena cantidad de personas hacia los Estados Unidos (Fry *et al.*, 1993).

En las últimas décadas, estudios relacionados con la epidemiología de la enfermedad indican que los cambios genéticos dentro de las poblaciones de este patógeno están ocurriendo de forma acelerada (Paez *et al.*, 2005), la aparición de cepas resistentes a metalaxyl (Gisi & Cohen, 1996) y la presencia de un tipo diferente de apareamiento conocido como A2 desde inicios de los 80's en diferentes regiones del mundo (Goodwin & Drenth, 1997) constituyen un ejemplo claro del cambio constante de las poblaciones. Sumado a esto, la presencia de fenómenos migratorios en diferentes regiones consecuencia de la comercialización de productos y actividades de exportación han favorecido significativamente la coexistencia de genotipos nuevos con genotipos locales, contribuyendo de esta manera al cambio poblacional y al incremento de la variabilidad de *P. infestans*, manifestada en la presencia de nuevos genotipos (Paez *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2005).

Para sur América, esta situación es particularmente interesante, Pérez, *et al.* (2001) reportan para Perú la presencia de nuevos genotipos para la región previamente registrados en Ecuador, Colombia y Venezuela. Igualmente en Ecuador, donde se reporta la más alta diversidad genética de las poblaciones de *P. infestans* respecto a otros países Andinos (Adler *et al.*, 2004), los cambios más destacados involucran la aparición del tipo de apareamiento A2 en especies de tipo silvestre (Oyarzun *et al.*, 1997; Ordoñez *et al.*, 2000); y el desplazamiento del genotipo US-1 por el EC-1, en cultivos de papa y tomate (Forbes *et al.*, 1997). Y por último Colombia donde es evidente la presencia de los linajes EC-1 y EC-3 que se asumen provienen del Ecuador (Lagos, 2002; Eraso & Ordoñez, 2005).

Estos cambios en las poblaciones del patógeno han permitido el establecimiento eficaz de genotipos mucho más agresivos, con mayor éxito reproductivo y grados de virulencia diferentes al inicial que han dificultado el uso efectivo de medidas de control convencionales (Samaucha & Gisi, 1987). Generalmente bajo esta situación la amenaza por la aparición de posibles epidemias se ha incrementado considerablemente (Castaño, 1996), obligando a los agricultores a utilizar cantidades cada vez mayores de fungicidas y productos químicos para contrarrestar los efectos de la enfermedad dentro de sus cultivos con el fin de disminuir las pérdidas económicas generadas por el patógeno (Dowley *et al.*,

2000; Garry *et al.*, 2001); las cuales ascienden aproximadamente a 3.25 billones de dólares anuales en los países en desarrollo y generan un gasto de 750 millones de dólares en el tratamiento químico (GILB, 2006).

Dado el alto potencial económico de muchas de las especies de solanáceas dentro de los mercados extranjeros, la caracterización de fitopatógenos se ha convertido en una actividad necesaria dentro de las investigaciones agrícolas (Calderón & Castro, 2002). La utilización de marcadores fenotípicos y genotípicos, además de evaluar el nivel de variación de las poblaciones de *P. infestans* contribuyen significativamente al conocimiento de los cambios poblacionales (Adler *et al.*, 2002; Forbes *et al.*, 1997), epidemiología y patrones evolutivos del patógeno (Fry *et al.*, 1993), que ayudan a entender la estructura genética y la dinámica *Phytophthora/Solanáceas*, principalmente sobre hospedantes potenciales con una importante influencia económica sobre los que se conoce existen efectos devastadores (Adler *et al.*, 2004).

Complementando el seguimiento del patógeno que se tiene en Colombia y en el mundo (Gilchrist, 2001), detectar la variación genética de las poblaciones locales y los factores que inducen de manera notable esta variación permite dar las pautas iniciales para el establecimiento de estrategias de control efectivas contra el “tizón tardío” (Fry *et al.*, 1993; Dowley *et al.*, 2000), aun más en regiones con elevada susceptibilidad a la enfermedad, y donde las epidemias pueden ser muy invasivas (Kamoun *et al.*, 1999).

Por lo tanto, el estudio genotípico de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary obtenidas de diferentes especies de solanáceas cultivadas en las zonas productoras de Nariño y Putumayo abordado en este proyecto, brinda un conocimiento general sobre el estado actual de la población en términos de su estructura genética con el fin de analizar a fondo la dinámica del patosistema *Phytophthora/solanácea* en esta región. Estas observaciones pueden servir de base para establecer estrategias de control acordes con las características poblacionales del patógeno a nivel local.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar genéticamente las poblaciones de *Phytophthora infestans* obtenidas de diferentes especies de solanáceas cultivadas en las zonas productoras de Nariño y Putumayo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar los haplotipos mitocondriales de cada una de las poblaciones analizadas mediante el polimorfismo de bandas electroforéticas de DNA mitocondrial a través de la técnica PCR-RFLP's

Establecer los posibles linajes clonales presentes en cada una de las poblaciones analizadas con base en la determinación de los haplotipos mitocondriales comparando los resultados obtenidos con cepas previamente caracterizadas para los hospedantes analizados en este trabajo.

3 MARCO TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS DE *Phytophthora infestans*.

Durante varias décadas, la ubicación taxonómica y clasificación de *P. infestans* giró alrededor de la similaridad morfológica que presenta este patógeno con diferentes poblaciones de hongos. Su particular forma filamentosa parecida a hifas, permitió que inicialmente el patógeno fuera catalogado dentro del grupo de los hongos (Erwin & Ribeiro, 1996); sin embargo, actualmente la clasificación de este fitopatógeno se ha replanteado ubicándose bajo el siguiente esquema (GBIF-Global Biodiversity Information Facility, 2007; Taxonomy Browser. NCBI- National Center of Biotechnology Information, 2007):

REINO	Chromista
DIVISION:	Heteroconta
CLASE:	Heteromycotina
PHYLUM:	Oomycota
SUBCLASE:	Saprolegniomycetidae
ORDEN:	Phytiales
FAMILIA:	Phytiaceae
GENERO:	<i>Phytophthora</i>
ESPECIE:	<i>infestans</i>

Las particularidades de este phylum describen características como la carencia de pigmentos fotosintéticos, la presencia de un par de flagelos en las zoosporas y en los gametos masculinos, formación de paredes ricas en celulosa o polímeros similares a la glucosa y el desarrollo tanto de hábitos terrestres como acuáticos (Jaramillo, 2003), la mayor parte de su ciclo de vida es diploide a diferencia de los hongos que presentan un ciclo de vida haploide (Erwin & Ribeiro, 1996).

En el caso de las especies del género *Phytophthora*, su diferencia respecto a otros grupos radica en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) (Erwin & Ribeiro, 1996) y ciertas características bioquímicas relacionadas con la síntesis de lisina que los separan evolutivamente del grupo de los hongos (Deacon, 1990), relacionándose filogenéticamente con el grupo de algas pardas (Judelson, 1996). Se ha encontrado que existen más de 60 especies dentro del género adaptadas para cumplir roles como patógeno de plantas (Goodwin, 1997), entre estas el patógeno mejor conocido es *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío en la papa y el tomate (Kamoun, 2003)

Aunque en la actualidad ya no se considera un hongo, para su descripción aun se utiliza la terminología empleada para designar morfológicamente a los hongos. Esta especie se caracteriza por presentar esporangióforos que se ramifican simpodialmente con formas ovoides, elipsoides y limoniformes (Erwin & Ribeiro, 1996), estos esporangios se pueden desprender y ser arrastrados por el agua o por el aire, se activa hasta que la zoospora

pueda encontrar hospedantes en distancias cortas, dando una notable ventaja al patógeno (Goodwin, 1997)

Phytophthora infestans se caracteriza por ser una especie heterotálica, bisexual y auto incompatible, que presenta dos tipos de apareamiento (A₁ y A₂) para el desarrollo de estructuras sexuales y la formación de oosporas características del phyllum, estas oosporas pueden entrar en estado de reposo y tolerar condiciones de estrés permaneciendo inactivas en condiciones desfavorables para la germinación (Jaramillo, 2003). Además, su carácter sexual provee al patógeno de enormes ventajas en comparación al estado asexual de propagación: son fuente de inóculo a largo plazo (Rivera-Peña, 1995), presentan una evidente resistencia mecánica y elevada resistencia a fungicidas (Drenth *et al.*, 1995).

La presencia del tipo de apareamiento A₂ ha sido reportada desde 1981 en Europa (Drenth *et al.*, 1993), Egipto (Shaw *et al.*, 1985), Estados Unidos (Dealh *et al.*, 1991) y norte de México (Goodwin *et al.*, 1992), Argentina, Brasil y Ecuador (Adler *et al.*, 2002), previo a esto los reportes existentes acerca del tipo de reproducción presente en las poblaciones del patógeno eran exclusivamente A₁, y la reproducción sexual había sido reportada únicamente en México (Fry *et al.*, 1992; Fry *et al.*, 1993; Ko, 1994). La presencia de un nuevo tipo de apareamiento transformó la condición clonal de *P. infestans* generando poblaciones con elevada variabilidad genética producto de la reproducción sexual (Drenth *et al.*, 1993; Goodwin, 1997), provocando el intercambio y recombinación de los factores de virulencia favoreciendo el apareamiento de nuevas cepas del patógeno con genotipos más agresivos y dificultando el manejo de la enfermedad (Fry *et al.*, 1993).

Dentro del ciclo infeccioso, la patogenicidad de *P. infestans* empieza bajo condiciones húmedas con temperaturas inferiores a 12° donde libera zoosporas que nadan libremente en el agua, luego se enquistan y germinan generalmente formando un apresorio, de tal manera que la hifa de penetración ingresa directamente a través de la cutícula. Una vez dentro de la planta puede penetrar directamente por las células epidérmicas, se desarrolla intra e intercelularmente, proyectando estructuras a manera de hifas al interior de las células y los tubérculos que presentan la enfermedad que entran en contacto con las hojas después de la cosecha también son responsables de la infección (Coffey & Gees, 1991)

3.2 CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE *Phytophthora infestans*

Fuentes como mutación, parasexualidad y recombinación mitótica han favorecido una amplia variación en las poblaciones de *P. infestans*, estos cambios pueden ser introducidos a otra población por procesos de migración y generalmente son medidos con la utilización de marcadores moleculares, bioquímicos o fenotípicos posibilitando la identificación de aislamientos distintos en una población (Jaramillo, 2003). Un gran avance para analizar estos aislamientos ha sido el desarrollo y la utilización de técnicas moleculares las cuales han permitido ampliamente el estudio de la diversidad genética y los orígenes de la evolución en poblaciones de diferentes géneros de hongos hasta el punto de entender las relaciones filogenéticas a un alto nivel taxonómico en muchos de estos organismos (Ristaino, 1998).

En el caso de *P. infestans*, los estudios poblacionales de las dos últimas décadas, se han centrado en evaluar de manera efectiva la variación intraespecífica e interespecífica de las poblaciones de *Phytophthora* utilizando características fenotípicas (tipo de apareamiento, virulencia/agresividad de razas y sensibilidad a Metalaxyl u otros fungicidas), marcadores bioquímicos (isoenzimas *Gpi* y *Pep*) y moleculares (Polimorfismos en fragmentos de restricción en DNA nuclear y mitocondrial, pruebas de DNA, y PCR para la transcripción de regiones largas y cortas de la subunidad ribosomal del DNA, análisis fingerprinting usando la sonda RG57, PCR específico para detectar tipo de apareamiento, análisis ITS y microsatélites (Jaramillo, 2003; Paez *et al.*, 2005)

Los marcadores moleculares utilizados para la caracterización de *Phytophthora infestans*, han permitido entender la variedad de polimorfismos en todo tipo de aislamientos, así mismo, se han establecido como herramientas útiles para establecer o confirmar las hipótesis de las migraciones de *P. infestans*, responsables de desbordar los problemas de la gota o tizón tardío en muchas partes del mundo (Fry & Goodwin, 1997). Igualmente la extrema diversidad del patógeno en las poblaciones de países como México central ha sido ratificada actualmente mediante la utilización de técnicas moleculares (Calderón & Castro, 2002)

La utilización de técnicas como PCR han sido ampliamente justificada para las poblaciones del complejo *Phytophthora*: (1) Permite un monitoreo de las poblaciones con el fin reconocer los estados iniciales de una epidemia y poder implementar métodos óptimos de control (Griffith & Shaw, 1998), (2) Es un método rápido, con poco consumo de tiempo ya que no se necesita aislar el microorganismo (Henson & French, 1993); (3) es una técnica sensible y versátil, por ende permite detectar el patógeno usando pequeñas cantidades de micelio (Henson & French, 1993; Lee, 1993); (4) permite la detección del patógeno en tejidos donde es difícil identificar esporangios o ciertas características morfológicas pueden estar ausentes (Wansgsomboondee & Ristaino, 2002) y sobretodo (5) en el caso de que las poblaciones estén siendo atacadas por diferentes especies o poblaciones de *Phytophthora*, la utilización de PCR puede ayudar a establecer esta diversidad (Nieplod & Schöber-Butin, 1995; Tooley *et al.*, 1997).

Un ejemplo práctico de la utilización de técnicas moleculares se ha observado en la determinación del tipo de apareamiento, a partir de la amplificación en el locus S1 identificado por Judelson *et al.*, 1996, el cual corresponde a una secuencia monomérica de 1.35 Kb que evolucionó por repeticiones sucesivas a 300kb y que es bien conservada en el estado hemicigótico A₁ (Judelson, 1996). El tipo de apareamiento y sus marcadores no presentan una segregación mendeliana y su identificación se basa en la técnica PCR con un primer específico el cual establece una región adyacente al locus del tipo de apareamiento A₁ (Van der Lee *et al.*, 1997)

El rápido reconocimiento del tipo de apareamiento A₂ después de la década de los 80's condujo a los patólogos a obtener resultados de la presencia de este tipo de apareamiento en casi todo el mundo. Para el caso de Suramérica, el apareamiento A₂ se encontró principalmente en Argentina, Brasil y Ecuador (Adler *et al.*, 2002), (Tabla 1).

Tabla 1. Tipo de apareamiento reportado para Suramérica. Fuente: Tabla modificada de Adler N, *et al.*, *Phytophthora infestans* sensu lato in South America population substructuring through host-specificity. 2002

País	Especie de planta estudiada	Tipo de apareamiento
Argentina	Papa, tomate	A1, A2
Bolivia	Papa	A2
Brasil	Papa, tomate	A1, A2
Chile	Papa	A1
Colombia	Papa, tomate	A1
Ecuador	Papas tomate, pepino y solanáceas silvestres	A1, A2
Perú	Petota, tomate. <i>S. capirensis</i>	A1
Uruguay	Papa	A2
Venezuela	Papa	A1

En Colombia, la presencia del tipo de apareamiento A₂ se registra desde 1990 (Fry et al., 1993); sin embargo, evaluaciones posteriores a ese reporte no han reportado la presencia de este tipo de apareamiento en poblaciones de *P. infestans* (Jaramillo, 2003). No obstante, dado el manejo en cuanto la importación de semillas de otros países con presencia de apareamiento A₂, es necesario la utilización de técnicas que permitan un continuo monitoreo de las poblaciones del patógeno presentes en el país para detectar rápidamente la aparición de este tipo de apareamiento (Calderón & Castro, 2002)

3.2.1 Haplotipos mitocondriales en *P. infestans*. La utilización del genoma mitocondrial en diferentes organismos ha sido bastante común desde hace varias décadas, mas de 150 genomas mitocondriales han sido secuenciados de animales plantas hongos y protistas; sin embargo son pocos los genomas de patógenos de plantas que han sido secuenciados, siendo el mas común el genoma mitocondrial de *P. infestans* (Avila-Adame et al., 2006)

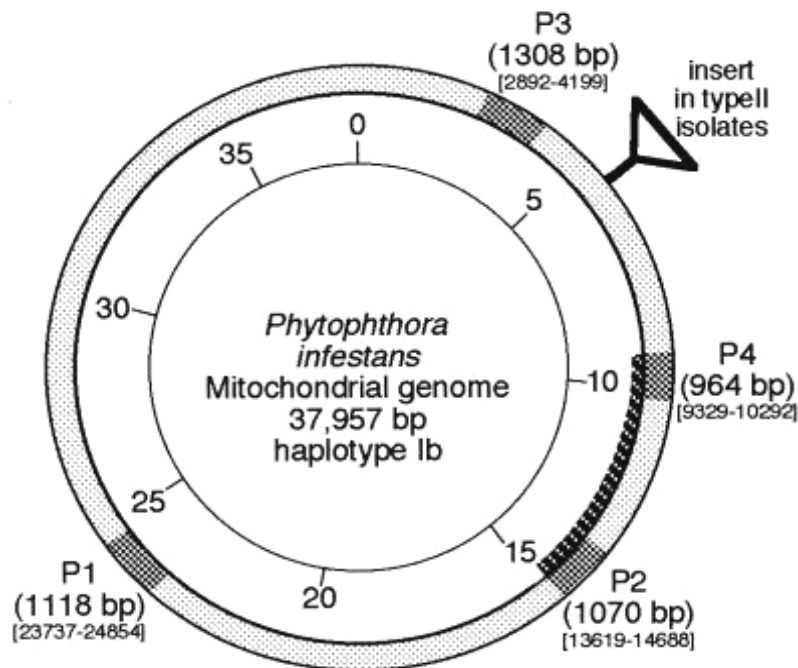
El análisis de los haplotipos mitocondriales se ha basado en técnicas de RFLP's (*Restriction fragment length polymorphisms*), en la cual se extrae el DNA de origen mitocondrial o nuclear y se trata con enzimas de restricción que cortan las moléculas de DNA en sitios específicos con el fin de detectar algún tipo de variación del genoma, esta es una técnica que permite analizar de forma precisa las poblaciones de *P. infestans* (Jaramillo, 2003).

Carter *et al*, en 1990, a partir del análisis de 24 aislamientos obtenidos de 11 países determinó cuatro polimorfismos en DNA mitocondrial denominados haplotipos mitocondriales (Ia, Ib, IIa, IIb) (Carter et al., 1990). Estos patrones de DNA han sido útiles para identificar el origen de varios aislamientos y su grado de afinidad, de igual manera Goodwin (1991), confirmó mediante la utilización de técnicas de Southern la presencia de estos cuatro haplotipos en las poblaciones del patógeno, que se identificaron como A, B C y D.

Griffith y Shaw (1998) diseñaron cuatro pares de “primers” para la amplificación por PCR de regiones polimórficas conocidas del genoma mitocondrial de *P. infestans*, lo que permitió la identificación de los haplotipos Ia, Ib, IIa y IIb (Figura 1), indicando que el DNA que puede ser usado para la amplificación puede ser extraído directamente de los folíolos de papa y tomate con pequeñas lesiones de tizón tardío, lo que permite monitorear de manera rápida y eficiente la población de *P. infestans*.

La amplificación por PCR de P1 (1118 pb) y P2 (1070 pb), seguida por digestión con las enzimas de restricción *CfoI* y *MspI*, respectivamente, permite la identificación sin ambigüedades de los cuatro haplotipos mitocondriales Ia, Ib, IIa y IIb. El tipo II difiere del tipo I por un inserto de 1.6 kb y por un rearrreglo de las secuencias flanqueantes (Griffith & Shaw, 1998). Adicional a esto, en 1994, Koh *et al*, encontraron dos haplotipos diferentes utilizando el método de Goodwin en 124 aislamientos del Oeste de Asia, los cuales fueron denominados como E y F, proponiendo un esquema de relaciones entre los diferentes sistemas de haplotipos.

Figura 1. Representación del genoma mitocondrial de *P. infestans* donde se ilustra la ubicación de los productos de amplificación P1, P2, P3 y P4. Fuente: Griffith, G & Shaw, D. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*. Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or from Host Lesions. (1998).



A partir de esto se establecieron dos sistemas de nomenclatura para seis tipos del DNA mitocondrial de *P. infestans*, los haplotipos I-a y I-b fueron determinados por el método PCR-RFLP que al parecer responden a los haplotipos A de Goodwin *et al* (1998); Los

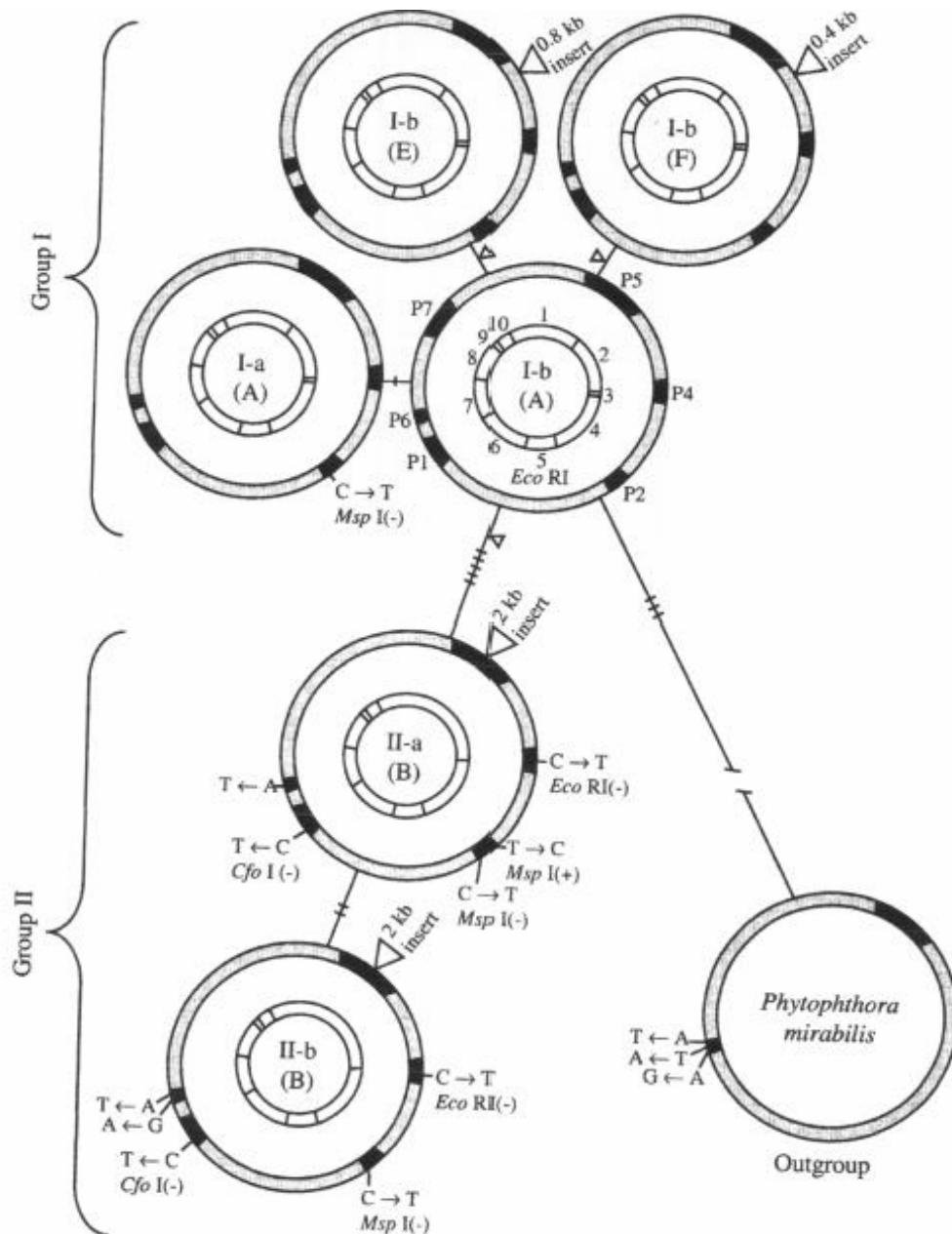
haplotipos II-a y II-b corresponden a los haplotipos B de Goodwin (1991); se ha determinado igualmente que el haplotipo C difiere del A por una inserción y el D por tener varias mutaciones y respecto a los haplotipos determinados por Koh, el E (I-b) tiene una delección con respecto al haplotipo A (I-a) y el F (I-b) tiene una inserción (Gavino & Fry, 1998)

A partir de esta información se conformaron dos grupos I y II: el grupo I con los haplotipos Ib (haplotipos E, F y A, según Goodwin, 1991) y Ia (haplotipo A, según Goodwin, 1991); y el grupo II conformado por el haplotipo IIa y IIb (haplotipo B, según Goodwin, 1991). Según Carter *et al* (1990) y Gavino y Fry (2002) el haplotipo Ib de Carter difiere del Ia por el cambio de un nucleótido (CxT) perdiendo un sitio de restricción *MspI* y Ia o Ib, podría ser el haplotipo mitocondrial ancestral de los demás genotipos.

Según los mismos autores en el grupo II, el haplotipo IIa difiere del Ib por un inserto de 2Kb en la región P5, lo que sugiere que los haplotipos tipo I dieron origen a los haplotipos tipo II. Además de los cambios en las regiones P4, P2 P1 y P6. En la región P4 la sustitución de un nucleótido (CxT) se relaciona con la pérdida de sitio de restricción para *EcoRI*. En la región P2 el cambio (TxG) dio la ganancia de sitio de restricción para *MspI* y el cambio (CxT) dio la pérdida de sitio de restricción para *MspI*. En la región P1 el cambio (CxT) pierde el sitio de restricción para *CfoI* y en P6 presenta un cambio (AxT). Por último el haplotipo IIb difiere de IIa por la sustitución de dos nucleótidos en la región P6 así: (AxT) y (GxA) (Figura 2)

Figura 2. Relación entre los haplotipos encontrados en *P. infestans*: haplotipos Ia, Ib, IIa y IIb por Carter *et al.*, 1990 y los haplotipos A, B, E y F determinados por Goodwin formando

los grupos I y II, 1991. Fuente: Gavino P y Fry W. Diversity in and evidence for selection mitochondrial genome of *Phytophthora infestans*. (1998)



La figura muestra los sitios de corte para las enzimas *EcoRI*, *MspI* y *CfoI*, el círculo interno muestra el mapa de restricción para *EcoRI*. Las regiones en negro son las regiones analizadas para polimorfismos: región P1, P2, P3, P4, P5, P6 y P7. El número de sustitución de nucleótidos y de inserciones que difieren entre los haplotipos es indicado en las ramas que conectan los haplotipos.

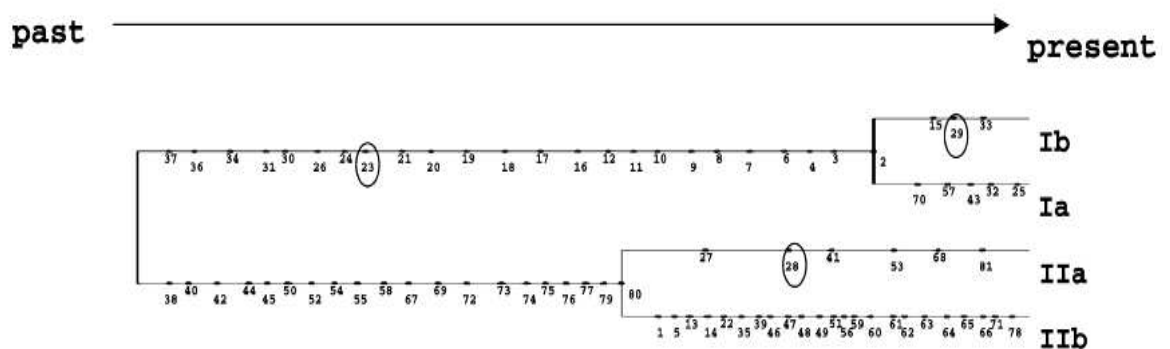
Al respecto, los estudios de Avila-Adame (2006) realizados con el fin de determinar la evolución y diversidad del genoma mitocondrial de *P. infestans* indican que la principal

diferencia entre los haplotipos mitocondriales encontrados en el patógeno se relaciona con la variación en el tamaño del genoma. Los tamaños encontrados para los cuatro haplotipos fueron 37922, 37957, 39870 y 39840pb para los tipos Ia, Ib, IIa, IIb respectivamente. El genoma del haplotipo Ib fue 1913pb más pequeño que el genoma del haplotipo IIa y 1883pb más pequeño que el haplotipo IIb. El genoma del haplotipo IIa fue 30pb mas largo que la del genoma del haplotipo IIb.

Adicional a esta información se determinó que los cuatro haplotipos fueron distinguidos por 44 mutaciones dentro de dos linajes correspondientes a los haplotipos tipo I y tipo II. A través del proceso de evolución, un cambio (GxT) dividió los haplotipos tipo II dentro de los linajes a y b y de forma más reciente durante la evolución un cambio (AxT) separo el haplotipo Ia del haplotipo Ib. Al parecer las mutaciones fueron más frecuentes en el haplotipo IIb que en el haplotipo IIa y los haplotipos tipo II divergieron mucho más rápido de un linaje común ancestral que los haplotipos de tipo I

A diferencia de estudios previos, los resultados de Avila-Adame *et al.*, (2006) muestran que a pesar de que los haplotipos I y los haplotipos II presentan un ancestro común ellos claramente forman linajes separados que han evolucionado independientemente. El linaje tipo II no evoluciono de los linajes tipo I como se sugirió previamente (Gavino y Fry, 2002), los dos haplotipos divergieron al mismo tiempo aunque el haplotipo Ib es mas similar al ancestro común que los otros haplotipos por las pocas mutaciones presentes en el genoma (Figura 3).

Figura 3. Genealogía que muestra la distribución de las mutaciones dentro de los cuatro linajes mitocondriales de *P. infestans*. Fuente: Avila- Adame., *et al.* Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. (2006)



La mutación 23 es reconocida por la endonucleasa *EcoRI* y separa los haplotipos I de los haplotipos II (digestión 964 pb PCR-RFLP, producto conocido como región P4). Las mutaciones 28 y 29, localizadas dentro de los linajes tipo I y II, respetivamente forman una secuencia reconocida por la endonucleasa *MspI* (la digestión e esta región conocida como P2 separa el haplotipo a del b dentro de los linajes tipo I y II, respetivamente)

3.2.2 Determinación de linajes clonales. La determinación de los haplotipos mitocondriales ha permitido la asociación de linajes clonales específicos en cada una de

las regiones del mundo, Según Anderson and Kohn (1995) un linaje clonal se define como “Los descendientes asexuales de un genotipo dado que difieren del ancestro clonal únicamente por mutación o por recombinación mitótica” (Anderson & Kohn, 1995), por lo tanto estas subpoblaciones presentan gran similitud genética entre individuos (Goodwin, 1997)

Este es un concepto ampliamente usado para organismos con reproducción asexual y con estructuras poblacionales simples y homogéneas. Para *P. infestans* la definición de linaje clonal ha sido basada en diversos marcadores genéticos incluyendo tipo de apareamiento, Glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*) y peptidasa (*Pep*), fingerprinting de ADN nuclear, sonda RFLP RG57, AFLP y SSR. Estos linajes son frecuentemente denominados por las iniciales del país donde fueron encontrados y por un sufijo numérico que representa linajes derivados del original. Así por ejemplo, se considera que los aislamientos que participaron en la primera migración masiva de *P. infestans* desde México hacia Europa y EEUU, pertenecen al linaje US-1, mientras que aquellos reportados en Ecuador se denominan EC-1, EC-2 y EC-3 (Adler *et al.*, 2004).

Para las poblaciones de *P. infestans* existe una asociación clara entre el haplotipo mitocondrial y la determinación de linajes clonales. En general los haplotipos A, E y F, se consideran más antiguos, al igual que el linaje clonal US-1, al que se encuentran asociados, siendo este el linaje más antiguo de los linajes existentes (Jaramillo, 2003). Sin embargo, estos no son los únicos linajes clonales presentes en las poblaciones de *P. infestans*. Para Suramérica se han registrado otros linajes clonales teniendo en cuenta la determinación de haplotipos mitocondriales como se resume en la siguiente tabla (Adler *et al.*, 2002).

Tabla 2. Haplotipos y linajes clonales reportados para Suramérica. Fuente: Tabla modificada de Adler N, *et al.*, *Phytophthora infestans* sensu lato in South America population substructuring through host-specificity, 2002.

País	Especie de planta estudiada	Haplotipo	Linaje clonal
Argentina	Papa, tomate	Ia, Ila	AR-1, AR-2, AR3, AR-4, AR-5, BR1
Bolivia	Papa	Ila	BR-1
Brasil	Papa, tomate	Ia, Ila	BR-1
Chile	Papa	Ib	BR-1
Colombia	Papa, tomate	Ila, Ib	US-1, EC-1, EC-3
Ecuador	Papas tomate, pepino y solanáceas silvestres	Ia, Ila, Ib, Ic	US-1, EC-1, EC-2, EC-3
Perú	Petota, tomate. <i>S. capirensis</i>	Ia, Ila, Ib	US-1, EC-1, PE-3, PE-5, PE-6
Uruguay	Papa	Ila	BR-1
Venezuela	Papa	Ila, Ib	US-1, EC-1

Uno de los linajes que se encuentra mejor reportado en muchos de los países del mundo, entre ellos Chile, Colombia, Ecuador y Perú corresponde al linaje clonal US-1 (Speilman *et al.*, 1991), este linaje es definido por un modelo de bandeo RFLP con la sonda RG 57,

la glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*) 86/100, la peptidasa (*Pep*) 92/100, y el tipo de apareamiento A1 (Forbes *et al.*, 1998).

En el caso de Ecuador se han reportado cuatro linajes clonales: a) US-1 correspondiente a la antigua población que prevalece en tomate, con el tipo de apareamiento A1 y el haplotipo mitocondrial Ib. b) EC-1 que representa el 95% de la población de *P. infestans* con el tipo de apareamiento A1 y el haplotipo mitocondrial IIa, y resistente al metalaxyl. Ambos linajes, US-1 y EC-1 solo afectan especies tuberíferas. c) EC-2 posee el tipo de apareamiento A2 y ataca solanáceas no tuberíferas; y d) EC-3 con el tipo de apareamiento A1 y que únicamente ataca a *Solanum betaceum* (Cav.) Sendtner (Adler *et al.*, 2004).

Para Colombia, los estudios relacionados con haplotipos mitocondriales se han enfocado principalmente a regiones como Antioquia, Cundinamarca, Boyacá y Nariño, sugiriendo que en Colombia la estructura poblacional de *P. infestans* es básicamente clonal y que hasta el momento se reportan 3 haplotipos mitocondriales: Ia, IIa y Ib, de los cuales el haplotipo IIa es el predominante en papa y el haplotipo Ib es el predominante en *Solanum betaceum* (Tabla 3)

Tabla 3. Haplotipos mitocondriales y linajes clonales reportados en Colombia*

Región	Especie de planta estudiada	Nombre común	T.A	Haplotipo	Linaje clonal
Antioquia	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Papa – diferentes variedades	A1	Ila ^{a, b, d}	EC-1 ^{a, d}
Antioquia	<i>Solanum lycopersicum</i> f. <i>bot.ceraciforme</i>	Tomate ceraciforme o silvestre		Ib ^a	EC-1 ^a
Antioquia	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomate chonto	A1	Ib ^a , Ila ^{d, b}	US-1 ^a
Antioquia	<i>Solanum muricatum</i> Aiton.	Pepino de agua	A1	Ib ^a , Ila ^{b, d} , ND ^d	US-1 ^a , EC-1 ^a
Antioquia	<i>Solanum</i> sp.			Ila ^a	EC-1 ^a
Antioquia	<i>Solanum nigrum</i> L.	Hierba Mora	A1	Ila ^b	
Antioquia	<i>Solanum phureja</i> Juz. & Buk.	Papa criolla	A1	Ila ^{a, b, d}	EC-1 ^{a, d}
Antioquia	<i>Solanum betaceum</i> (Cav.) Sendtner	Tomate de árbol	A1	Ila ^b	-
Antioquia	<i>Physalis peruviana</i> Mill.	uchuva	A1	Ila ^b	-
Antioquia	<i>Capsicum annuum</i> L.	Ají	A1	Ila ^b	-
Antioquia	<i>Capsicum</i> spp			ND ^d	-
Caldas	<i>Solanum juglandifolium</i> Humb. & Bonpl. ex Dunal	Papera, Riñon, Riñonada	A1	Ila ^b	-
Cundinamarca y Boyacá	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Papa – diferentes var.	A1	Ila ^c	EC-1 ^c
Cundinamarca y Boyacá	<i>Solanum phureja</i> Juz. & Buk.	Papa criolla	A1	Ila ^c	EC-1 ^c
Norte de Santander	<i>Solanum</i> sp.	Papa		Ib ^a	US-1 ^a
Norte de Santander	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Papa – diferentes variedades		Ila ^d	EC-1 ^d
Nariño	<i>Solanum phureja</i> Juz. & Buk.	Papa criolla		Ila ^{d, t}	EC-1 ^{d, t}
Nariño	<i>Solanum betaceum</i> (Cav.) Sendtner	Tomate de árbol		Ia ^{d, e} , Ib ^t	EC-3 ^{d, e} , US-1 ^t
Nariño	<i>Solanum tuberosum</i> Subsp. <i>andigena</i> y Subsp. <i>Tuberosum</i>	Papa – diferentes variedades		Ila ^f	EC-1 ^f
Nariño	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomate de mesa		Ila ^e	EC-1 ^e
Putumayo	<i>Solanum betaceum</i> (Cav.) Sendtner	Tomate de árbol		Ia ^e	EC-3 ^e
Putumayo	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomate de mesa		Ila ^e	EC-1 ^e
Valle del Cauca	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	Tomate chonto		ND ^d	-

^a Gilchrist, 2001; ^b León, 2004; ^c Calderon y Castro, 2002; ^d Raigosa y Amaya, 2006; ^e Eraso y Ordoñez, 2005; ^f Lagos, 2002; ND: no se pudo determinar un haplotipo mitocondrial previamente reportado en Colombia ya que no amplificaron o arrojaron mezclas o perfiles de restricción diferentes.

* La recopilación de datos presentes en la tabla corresponde a información directa proporcionada por los respectivos autores.

* La denominación *Solanum lycopersicum* incluye al sinónimo *Lycopersicon esculentum*, considerando la clasificación presentada por el NCBI (2007).

4 METODOLOGÍA

Para la caracterización de las poblaciones de *P. infestans* se colectaron muestras compatibles con el patógeno en los departamentos de Nariño y Putumayo. Cada muestra se analizó a partir de la determinación de su haplotipo mitocondrial mediante la técnica PCR-RFLPs siguiendo el protocolo propuesto por Griffith & Shaw (1998). Una vez determinado su haplotipo este se comparó con previos reportes realizados en la región y en regiones cercanas. De igual forma fue analizado teniendo en cuenta su distribución en las regiones de muestreo incluidas en el estudio.

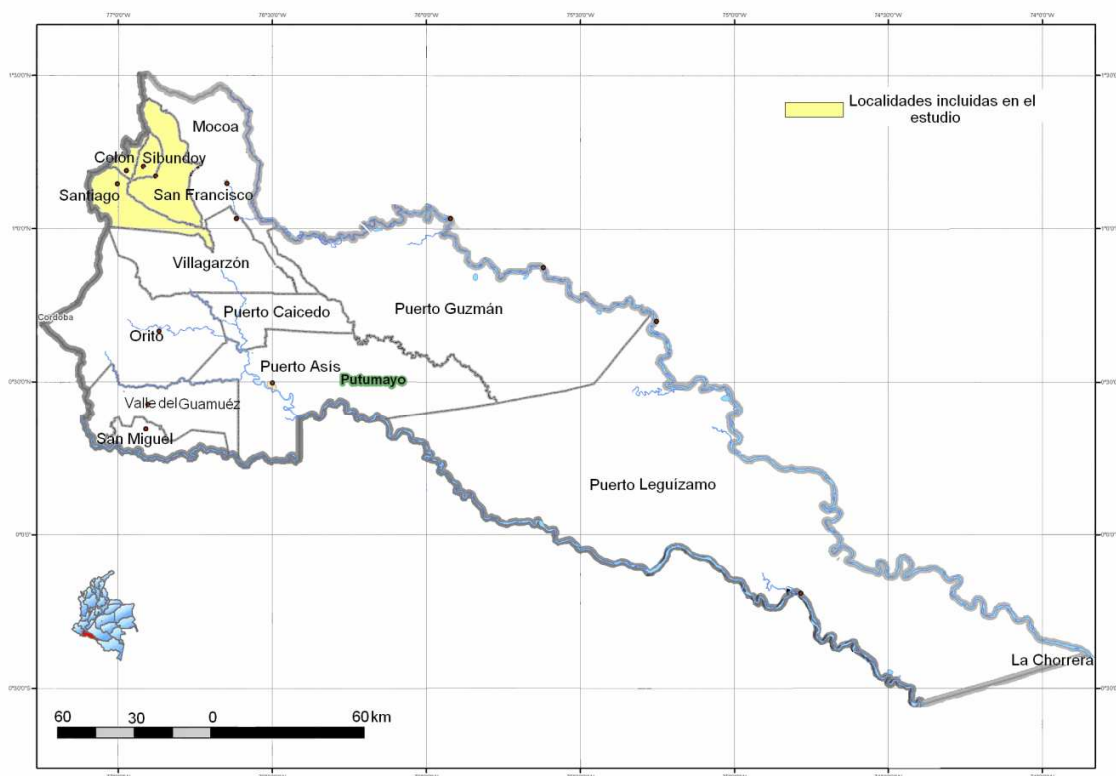
4.1 LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

En el estudio se incluyeron las zonas productoras de solanáceas de los departamentos de Nariño y Putumayo, localizados al sur de Colombia (Figura 4 y Figura 5).

Departamento de Putumayo. El departamento de Putumayo se encuentra ubicado en el extremo sur del país, entre los 0°40' latitud S y 1°25' latitud N, y entre los 73°50' y 77°10' longitud O. se caracteriza por presentar territorios que se extienden desde el piedemonte de la cordillera andina hasta la llanura amazónica. La zona específica para el muestreo en el departamento de Putumayo es el Valle de Sibundoy, el cual se encuentra ubicado en la zona occidental del departamento, en límites con el departamento de Nariño y cubre una zona de aproximadamente 151.932 Km² (ver Fig. 2)

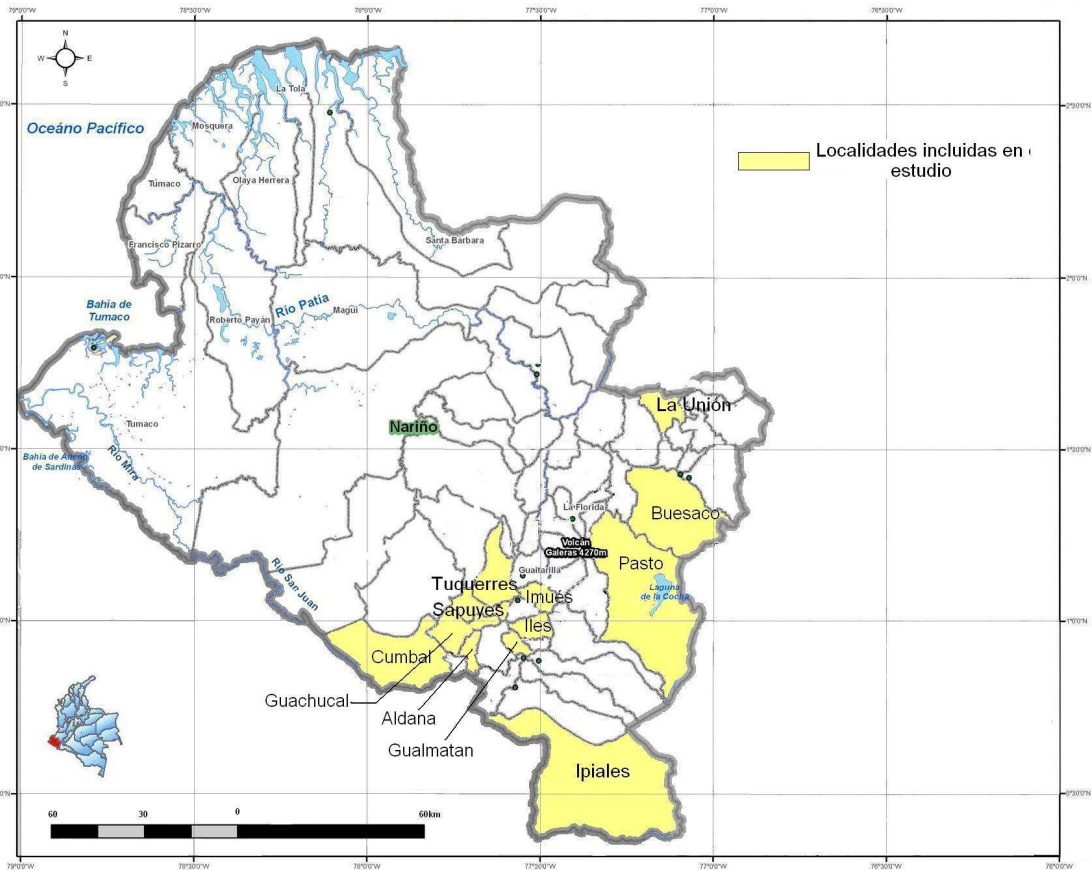
Las zonas de muestreo definidas en este estudio para el departamento del Putumayo corresponden a los municipios de Santiago (1.15'N 77.01'O), Sibundoy (1.18'N 76.89'O) y San Francisco (1.18'N 76.88'O). Estas hacen parte de la región andino amazónica del Departamento del Putumayo, corresponden a una región montañosa, en la que sobresalen los cerros Patascoy y Putumayo con alturas que sobrepasan los 3.500 m y en la que se encuentran climas cálido, medio, frío y páramo. La temperatura media anual es de 16.3 °C, con T^o máxima de 21.7 °C y una T^o mínima de 10.3 °C, presenta humedad relativa del 85%, la precipitación anual es de 1.400 mm aprox. Presenta una altitud que varía entre los 2.000 y 3.700 m.s.n.m. El brillo solar varía entre 500 y 700 h/año, con un valor anual de 669.9 h/año, con promedio mensual de 55.83 h/mes; el período de mayor expresión se presenta en el mes de enero 81.52 h/año, coincidiendo con la época de verano o de pocas lluvias y el menor registro en el mes de abril con 35.01 h/mes, en la época de intensas lluvias (OPCION PUTUMAYO, 2007).

Figura 4. Localidades incluidas en el estudio consideradas las zonas más productoras de solanáceas en Putumayo. Fuente: mapa modificado de <http://www.colombiassh.org/site/>



Departamento de Nariño. El departamento de Nariño está situado en el extremo suroeste del país, en el cual se distinguen tres unidades fisiográficas: la llanura del Pacífico, la región andina y la vertiente amazónica. El relieve presente en el Departamento se caracteriza por la presencia de temperaturas cálidas, templadas, frías y de páramo. Las lluvias en el área interandina son superiores a los 3.000 mm, disminuyendo en el altiplano nariñense donde son inferiores a los 1.000 mm; en el piedemonte amazónico las lluvias son superiores a los 4.000 mm. Los sitios de muestreo previamente definidos en este estudio para el departamento de Nariño corresponden a los municipios mostrados en la figura 5.

Figura 5. Localidades incluidas en el estudio consideradas las zonas más productoras de solanáceas en Nariño. Fuente: mapa modificado de <http://www.colombiassh.org/site/>



4.2 COLECCIÓN DE MUESTRAS EN CAMPO.

La toma de las muestras se realizó en las zonas descritas anteriormente, donde se determinó por observación directa y personal la presencia de la enfermedad. Cada uno de los cultivos visitados fue registrado teniendo en cuenta: Código del cultivo, hospedante, variedad, propietario, fecha en que se visitó el cultivo, coordenadas geográficas y localización del cultivo (Anexo A). De los cultivos infectados por el patógeno se tomó muestras de hojas, tallos y frutos con el fin de identificar la presencia del patógeno en laboratorio y realizar la caracterización correspondiente.

La confirmación del patógeno en laboratorio se realizó a partir de las características morfológicas: características del esporangio de forma limoniforme con papilas ramificados simpodialmente, longitud del esporangio (relación longitud-ancho), caducidad del esporangio, micelio con filamentos hialinos y cenocíticos (Jaramillo, 2003). Las características morfológicas fueron observadas en solución de lactofenol y fotografiadas con la cámara digital Canon Powershot A460.

4.3 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS POBLACIONES DE *Phytophthora*.

Para realizar la caracterización molecular de los aislados de *P. infestans* se utilizó la técnica RFLP-PCR (*Restriction fragment length polymorphism*) siguiendo los pasos descritos a continuación:

4.3.1 Extracción del DNA. Para la extracción de DNA se utilizó la metodología propuesta por Griffith & Shaw, (1998) para obtención de DNA a partir de micelo en agar y lesiones directas. El material a evaluar fue cortado en trozos pequeños y macerado en tubos eppendorf (1.7ml) con nitrógeno líquido hasta pulverizarlo. Posteriormente se adicionaron 800 μ l de buffer de extracción CTAB (100mM NaCl, 100mM Tris HCl (pH 8.0), 1,4 M NaCl, 2% CTAB, 20 mM EDTA) y se incubó a 65°C durante 1 hora. Después de la incubación se agregó 600 μ l de cloroformo y se realizó vortex durante 10 segundos. La suspensión fue centrifugada a 17.000 g durante 10 min. Se tomaron 600 μ l de la fase superior acuosa y se transfirió a un nuevo tubo donde se le adicionó 0.6 volúmenes de Isopropanol, se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugó nuevamente a 17.000 g durante 10 minutos. El líquido fue decantado y el pellet fue lavado con 1ml de etanol al 70% (Vol/Vol), los tubos se mezclaron e incubaron a 65°C durante 20 minutos antes de ser nuevamente centrifugados. Se decantó el sobrenadante y el pellet se puso a secar durante 30 min a 37°C. El DNA se resuspendió en buffer TE (10mM Tris HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)) y se almacenó a -20°C. La verificación del DNA se realizó en geles de agarosa al 1,8% suplementado con bromuro de etidio (10mg/ml)

4.3.2 Amplificación de DNA. Para la amplificación de las regiones polimórficas en el genoma mitocondrial de *P. infestans* se utilizó la metodología desarrollada por Griffith & Shaw (1998), utilizando cuatro pares de iniciadores "Primers" (Tabla 4). Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Techne) teniendo en cuenta un volumen total de reacción de 25 μ L. El mix de reacción estuvo formado por buffer de reacción 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001 %p/v de gelatina), 0,0075 mM de cada uno de los deoxinucleosidos trifosfato (dNTP), 0.81 μ L de cada uno de los primers forward y reverse (10 μ M; Tabla 4), 1.25 mM de MgCl₂, 160 μ g/mL de albumina de suero bovina (BSA, bovine serum albumine), y 1 U de *TaqDNA* polimerasa. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 94°C durante 90 segundos y 40 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 55°C durante 60 segundos, y 72°C durante 90 segundos, con una extensión final de 5 minutos a 72°C (Griffith & Shaw, 1998; Rohner A., 2002). La verificación de la presencia de DNA y su calidad se realizó mediante geles de agarosa al 2%, cargando 5 μ L del DNA diluido en cada uno de los pozos utilizando la escalera de peso molecular GenRuler 100pb marca Fermentas.

Tabla 4. Primers usados para amplificación de las regiones P1, P2 y P4 en el genoma mitocondrial de *P. infestans*. Fuente: Griffith, G & Shaw, D. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*. Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or from Host Lesions. (1998).

Región	Secuencia	Posición
P1	F1. 5'-GCAATGGGTAAATCGGCTCAA -3'	23737-23757
	R1. 5'-AAACCATAAGGACCACACAT-3'	24835-24854
P2	F2: 5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT -3'	13619-13639
	R2: 5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3'	14688-14667
P4	F4: 5'-TGGTCATCCAGAGTTTATGTT -3'	9329-9350
	R4: 5'- CCGATACCGATACCAGCACCAA-3'	10292-10271

Las posiciones indicadas se refieren a las posiciones del primer en el genoma mitocondrial de *P. infestans* en relación al extremo 5' origen la subunidad mas grande del gen rRNA mitocondrial.

4.3.3 Digestión con enzimas de restricción. Entre 7-12ul del DNA amplificado fueron digeridos con 10 U de la enzima de restricción *CfoI* para la región P1, 10 U de *MspI* para la región P2 y 10 U de la enzima *EcoRI* para la región P4 en una solución de digestión de 20µL que contiene buffer de restricción 1x (10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM Dithioeythrit), agua y el DNA a procesar, las condiciones para la digestión fueron las siguientes: a 37°C durante 3 horas (Griffith & Shaw, 1998). Las muestras de DNA digeridas se mezclaron con 5µL de buffer de carga (orange gel-loading buffer) marca fermentas y se cargaron sobre un gel de agarosa 2% utilizando escalera molecular GenRuler 100pb marca Fermentas. El gel se corrió a 100V durante 1 hora y 30 minutos. Los patrones de restricción fueron visualizados con un transiluminador UVP en el cual se tomaron las fotos correspondientes con una cámara digital Canon Powershot A460.

4.3.4 Análisis de Haplotipos mitocondriales. El análisis de los haplotipos mitocondriales se evaluó mediante los patrones electroforéticos obtenidos para cada enzima de restricción siguiendo la nomenclatura propuesta por Carter (1990) y Griffith & Shaw (1998) para la identificación de los haplotipos Ia, Ib, IIa, IIb característicos de las poblaciones de *P. infestans*, adicional a esta información se tuvo en cuenta reportes realizados por Ordoñez *et al* (2000) para el haplotipo mitocondrial Ic (Tabla 5) Estos resultados se compararon con estudios previos en Colombia y Ecuador.

Los haplotipos que no coincidieron con la codificación conocida para la determinación de haplotipos mitocondriales establecida hasta el momento se codificaron teniendo en cuenta las iniciales de haplotipo mitocondrial (H), las iniciales del hospedante (*sb*: *S. betaceum*; *sq*: *S. quitoense*; *sl*: *S. lycopersicum*) según el caso y el número de la población encontrada (I, II o III). Para estos haplotipos no se determinó el linaje clonal.

Tabla 5. Tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos después de la digestión de la región P1, P2 y P3 con su respectiva enzima. Fuente: Griffith, G & Shaw, D. (1998); Ordoñez *et al* (2000).

Región	Enzima	Haplotipos				
		Ia	Ib	IIa	IIb	Ic ^c
P1 (1118pb ^a)	<i>CfoI</i>	907, 211pb	907, 211pb	-	-	907, 211pb
P2 (1070pb ^a)	<i>MspI</i>	720, 350pb	641, 350, 79pb	720, 203, 147pb	720,350pb	720, 125, 100pb ^b
P4 (964pb ^a)	<i>EcoRI</i>	361, 394, 209pb	361, 394, 209pb	603, 361pb	603, 361pb	750, 209pb ^b ,

^a Tamaño para cada una de las regiones amplificadas; ^b Tamaños aproximados;

^c Reporte Ordoñez *et al* (2000); - Ausencia de sitios de restricción con la enzima utilizada

4.3.5 Distribución haplotipos mitocondriales. Cada uno de los puntos de muestreo caracterizados fueron ubicados en un mapa con el fin de conocer la distribución de los mismos. Para esto se utilizaron mapas realizados con el sistema de proyecciones cartográficas WGS84 Datum WGS84 mediante el programa ArcGIS 9.1 ESRI inc 2003. La distribución de los haplotipos y de las diferentes especies del complejo *Phytophthora* se analizó a partir de la proyección de cada uno de los puntos caracterizados, esta proyección se realizó con el programa ArcGIS 9.1 ESRI inc 2003 con las especificaciones del sistema de proyecciones cartográficas especificadas anteriormente.

4.3.6 Determinación de los linajes clonales: Cada linaje clonal es representado por un solo haplotipo mitocondrial y es característico de un hospedero en particular (Forbes *et al.*, 1998) por lo tanto la determinación de los posibles linajes clonales se realizó teniendo en cuenta el tipo de hospedero evaluado y el haplotipo mitocondrial encontrado. Estos resultados se compararon con reportes previos que confirmaran la presencia del linaje clonal en la región. Para el caso de haplotipos no reportados previamente no se determinó el linaje clonal.

5 RESULTADOS

5.1 COLECCIÓN DE MUESTRAS Y REGISTRO DE CULTIVOS EVALUADOS EN NARIÑO Y PUTUMAYO. La obtención de las muestras se realizó durante los meses de agosto de 2007 y enero de 2008 en regiones aledañas y cabeceras municipales de los departamentos de Nariño y Putumayo. Cada localidad evaluada en el estudio se incluyó teniendo en cuenta las zonas de mayor producción de solanáceas, así como reportes previos que indicaran la presencia de la enfermedad.

En Nariño se incluyeron los municipios de La Unión, Buesaco, Pasto, Gualmatán, Cumbal, Iles, Imués, Ipiiales, Guachucal, Aldana, Sapuyes y Tuquerres, principales productores de papa (*S. tuberosum*), papa amarilla (*S. phureja*), lulo (*S. quitoense* Lam.) y tomate de mesa (*S. lycopersicum*). Igualmente se colectaron muestras de tomate de árbol (*S. betaceum*), ají (*Capsicum spp*) y uvilla (*Physalis spp*), encontradas en jardines o huertas caseras cerca a los cultivos visitados que presentaran síntomas similares a los producidos por *P. infestans* (Tabla 6).

Tabla 6. Localidades y hospedantes incluidos en el estudio para el departamento de Nariño. Fuente: este estudio.

Municipio	Vereda o Corregimiento	Hospedante registrado
La Unión	-	<i>S. betaceum</i> ^a , <i>S. lycopersicum</i> ^a , <i>S. quitoense</i> ^a
Buesaco	-	<i>S. lycopersicum</i> ^a
Pasto	San Fernando	<i>S. tuberosum</i> ^a , <i>S. betaceum</i> ^b ,
	La Laguna	<i>S. tuberosum</i> ^a ; <i>S. phureja</i> ^a , <i>Physalis spp</i> ^b
	Catambuco, Chavez y Cabrera	<i>S. tuberosum</i> ^a ; <i>S. phureja</i> ^a , <i>S. betaceum</i> ^b , <i>Capsicum spp</i> ^b
	El Encano	<i>S. tuberosum</i> ^a , <i>S. betaceum</i> ^b
	Obonuco	<i>S. tuberosum</i> ^a , <i>S. betaceum</i> ^b , <i>Capsicum spp</i> ^b
Gualmatán	Quatis	<i>S. tuberosum</i> ^a
Cumbal	Tilizmal	<i>S. tuberosum</i> ^a
Iles	Capulí	<i>S. betaceum</i> ^a , <i>S. lycopersicum</i> ^a
Imués	Pilcuán	<i>S. lycopersicum</i> ^a
Ipiiales	-	<i>S. tuberosum</i> ^a
Guachucal	-	<i>S. tuberosum</i> ^a
Aldana	-	<i>S. tuberosum</i> ^a
Túquerres	-	<i>S. tuberosum</i> ^a
Sapuyes	El Espino	<i>S. tuberosum</i> ^a

^a Muestras tomadas en cultivos establecidos; ^b Muestras obtenidas de huertas caseras o jardines.

Para el departamento del Putumayo, los cultivos se ubicaron en los municipios de Sibundoy, San Francisco, Colón y Santiago, principales localidades productoras de lulo (*S. quitoense*) y tomate de árbol (*S. betaceum*) en sus diferentes variedades. Para esta región igualmente se incluyeron algunos cultivos no representativos como papa (*S. tuberosum*), pepino (*S. muricatum*) y tomate de mesa (*S. lycopersicum*). También se incluyó algunas muestras de tomate silvestre (*S. sibundoyensis*), ají (*Capsicum spp.*) y uvilla (*Physalis spp.*) (Tabla 7).

Tabla 7. Localidades y hospedantes incluidos en el estudio para el departamento de Putumayo. Fuente: este estudio.

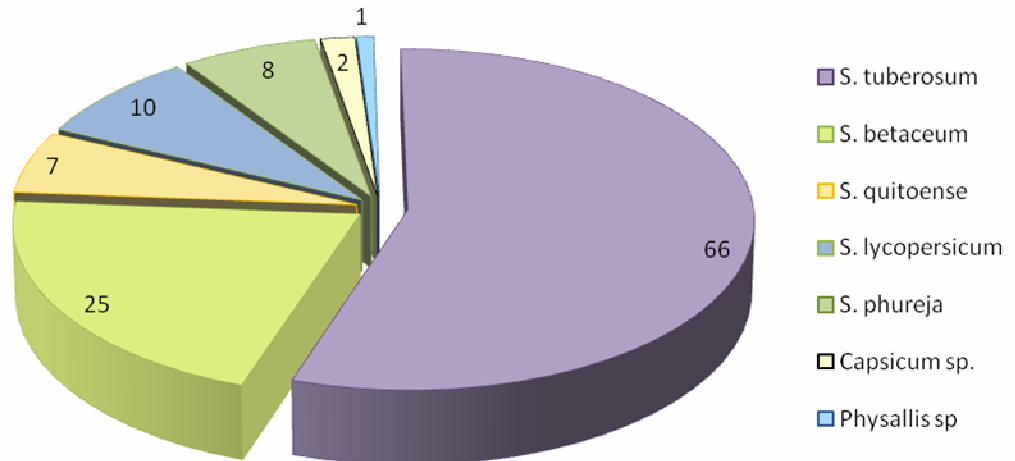
Localidad	Vereda o corregimiento	Hospedante registrado
Santiago	Las Cruces	<i>S. tuberosum</i> ^a , <i>S. betaceum</i> ^a
Colón	Las Palmas	<i>S. betaceum</i> ^a , <i>S. quitoense</i> ^a
Sibundoy	La Hidraulica	<i>S. tuberosum</i> ^a , <i>S. betaceum</i> ^a , <i>S. sibundoyensis</i> ^b , <i>S. quitoense</i> ^a , <i>S. muricatum</i> ^b , <i>Capsicum spp</i> ^b
San Francisco	SENA	<i>S. lycopersicum</i> ^a

^a Muestras tomadas en cultivos establecidos; ^b Muestras obtenidas de huertas caseras o jardines.

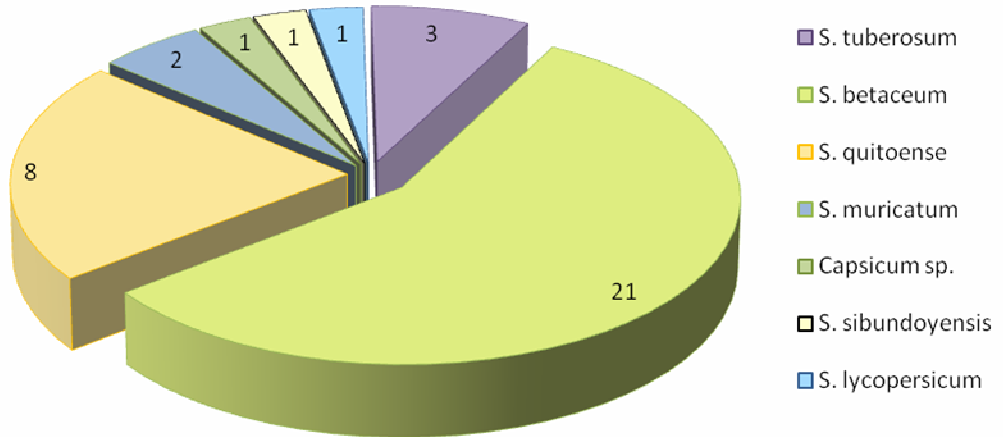
En total se evaluaron 156 cultivos para los dos departamentos; 119 para el departamento de Nariño y 37 para el departamento de Putumayo (Figura 6; Anexo A). Las frecuencias de cada uno de los hospedantes incluidos en el estudio para cada departamento se muestran en la figura 6.

Figura 6. Frecuencia de los cultivos evaluados en el estudio para los departamentos de Nariño y Putumayo. Fuente: este estudio.

Frecuencias en el departamento de Nariño



Frecuencias en el departamento de Putumayo



Del total de cultivos visitados solo fue posible conocer la variedad en *S. tuberosum*, *S. betaceum*, *S. quitoense* y *S. muricatum*, para el resto de hospedantes no se conoció la variedad cultivada. (Para cada departamento las variedades se especifican el Anexo B).

5.2 PRESENCIA DE *Phytophthora* EN LOS HOSPEDANTES EVALUADOS. Solo el 33.33% (52 cultivos) de los cultivos registrados presentaron síntomas típicos asociados a

la enfermedad (Anexo C). La sintomatología de las muestras positivas se asocio a necrosis ubicada hacia el ápice y esporulación blanquecina principalmente sobre el envés de la hoja (Erwin y Ribeiro, 1996). En *S. quitoense* no fue posible observar esta sintomatología por lo que estas características no se consideraron diagnosticas de la enfermedad. Para este caso, al igual que en *S. lycopersicum* y *S. betaceum* se tomaron diferentes regiones del tallo y frutos los cuales mostraron necrosis moderada en tejidos (Anexo D). En el caso de *S. betaceum* el crecimiento de la esporulación se observó en forma de anillos limitando el área de necrosis causada por el patógeno (Anexo D), estas observaciones también han sido reportadas en Ecuador por Oliva *et al*, en impresión.

Cada una de las muestras fue confirmada para la presencia del patógeno en laboratorio mediante observación microscópica encontrando morfología típica asociada al género *Phytophthora*: forma limoniforme con pedicelos cortos (Erwin & Ribeiro, 1996). Algunas poblaciones procedentes de tomate de mesa, pepino y tomate de árbol presentaron algún grado de variación respecto a la longitud de los esporangios, mostrando formas mucho mas alargadas que las convencionales (Anexo B). Estas observaciones se han reportado teniendo en cuenta las características morfológicas de las poblaciones aisladas de estos hospedantes (Erselius *et al.*, 1999).

De las nueve especies incluidas en el estudio, se encontraron síntomas relacionados con la enfermedad en los hospedantes con mayores áreas de cultivos en la región: *S. tuberosum*, *S. phureja*, *S. lycopersicum*, *S. betaceum* y *S. quitoense*. Igualmente se registraron muestras positivas para *S. muricatum* aunque su área de cultivo es muy escasa a diferencia de los otros hospedantes. No se encontraron muestras infectadas en *Capsicum spp.*, *Physalis spp.*, y *S. sibundoyensis* pese a que las muestras registradas se evaluaron cerca a cultivos infectados por el patógeno.

Se observaron diferencias respecto a las muestras positivas obtenidas para cada uno de los departamentos En el caso de *S. lycopersicum* y *S. phureja* solo fue posible obtener muestras positivas únicamente para Nariño a diferencia de *S. muricatum* que solo fue evaluada para Putumayo. (Tabla 8).

Tabla 8. Muestras positivas para los hospedantes incluidos en el muestreo. Fuente: este estudio.

Hospedante	Muestras positivas para Putumayo	Muestras positivas para Nariño
<i>S. tuberosum</i>	+	+
<i>S. phureja</i>	-	+
<i>S. betaceum</i>	+	+
<i>S. sibundoyensis</i>	-	-
<i>S. lycopersicum</i>	-	+
<i>S. quitoense</i>	+	+
<i>S. muricatum</i>	+	-
<i>Capsicum spp</i>	-	-
<i>Physalis spp</i>	-	-

+ Resultados positivos compatibles (sintomatología en campo y análisis microscópico);

- Muestras no compatibles con la presencia de especies del genero *Phytophthora*.

Adicional a las muestras positivas obtenidas en el estudio, se incluyeron 4 aislamientos de *S. betaceum* y 2 aislamientos de *S. tuberosum* previamente obtenidos en Nariño y que hacen parte de la colección de *P. infestans* de la Universidad de Nariño (Tabla 9)

Tabla 9. Aislamientos presentes en la Colección de *P. infestans* de la Universidad de Nariño. Fuente: Cepario de *Phytophthora infestans* Universidad de Nariño.

Código	Hospedante	Departamento	Localidad
100	<i>S. betaceum</i>	Nariño	Genoy
121	<i>S. betaceum</i>	Nariño	Genoy
127	<i>S. betaceum</i>	Nariño	Genoy
128	<i>S. tuberosum</i>	Nariño	Cabrera
152	<i>S. tuberosum</i>	Nariño	Catambuco
154	<i>S. betaceum</i>	Nariño	Genoy

5.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DE *Phytophthora* A PARTIR DE PCR-RFLP.

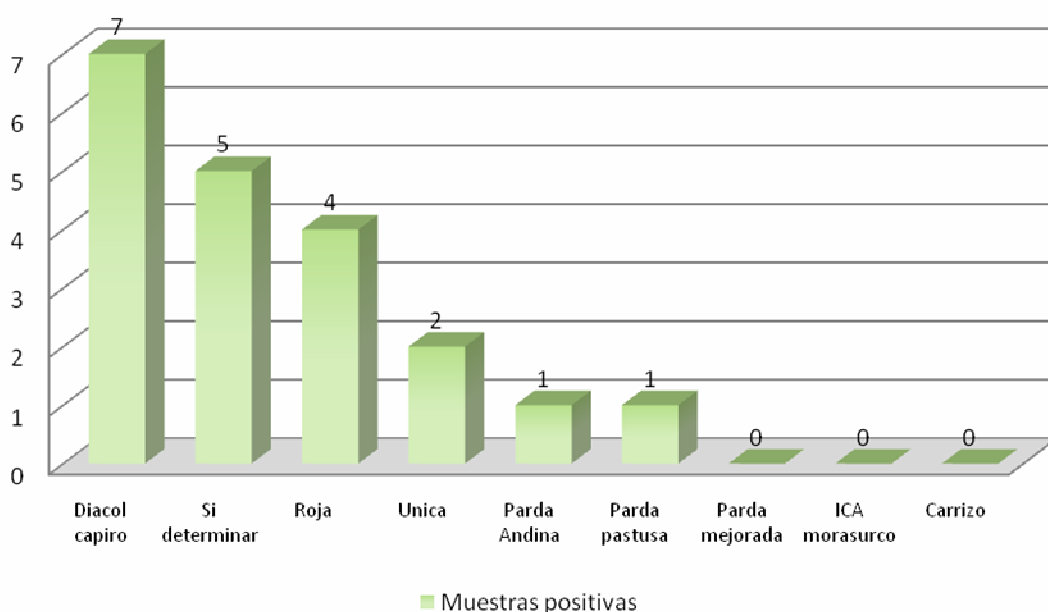
No se realizaron modificaciones a la metodología propuesta por Griffith & Shaw (1998) para extracción de ADN de *P. infestans*. La metodología utilizada reflejó una alta eficiencia en la obtención de ADN a partir de lesiones directas. Cada una de las muestras donde se encontró el patógeno amplificó para el conjunto de “primers” propuestos por Griffith & Shaw (1998). Los resultados de estas amplificaciones muestran fragmentos de 1118, 1070 y 964 pb para los primers F1-R1, F2-R2b y F4-R4 respectivamente, coincidiendo con lo reportado por los autores para la determinación de haplotipos mitocondriales en poblaciones del patógeno.

Los patrones electroforéticos obtenidos después de la digestión de cada uno de los amplicones con su respectiva enzima (materiales y métodos) indican la presencia de tres haplotipos mitocondriales claramente definidos en las muestras evaluadas; el haplotipo mitocondrial Ib, IIa y Ia, los dos primeros característicos de *P. infestans*, y el último correspondiente a una población reportada recientemente como *P. andina* encontrada en *S. betaceum*, *S. quitoense*, *S. muricatum*, *S. hispidum* y especies del complejo *Anarrhichomenum*, (Oliva *et al.*, en impresión).

Adicional a esto se obtuvo patrones diferentes a los previamente reportados que no concuerdan con la clasificación de haplotipos mitocondriales establecida para *P. infestans* (Carter *et al.*, 1990; Griffith & Shaw, 1998). Estos haplotipos que no correspondían a *P. infestans* o *P. andina* se catalogaron como *Phytophthora infestans sensu lato*, haciendo alusión a poblaciones que pueden representar a una o mas especies de *Phytophthora spp.* adaptadas a ciertos hospedantes que aun no han sido descritas satisfactoriamente (Ordoñez *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 2004)

En el caso de los cultivos de papa (*S. tuberosum* y *S. phureja*) el haplotipo mitocondrial IIa, fue el único encontrado en todas las muestras positivas independientemente de la variedad y localidad registrada (Anexo E y F). No obstante, se observaron diferencias en la frecuencia de la enfermedad respecto a la variedad encontrada. En el caso de *S. tuberosum* se encontró la presencia de *P. infestans* en las variedades *Roja*, *Parda Básica*, *ICA Huila* y *Diacol Capiro*, siendo esta última la variedad donde se reporta la mayor cantidad de muestras positivas. Por el contrario las variedades *Parda mejorada*, *Carrizo* e *ICA Morasurco* no presentaron muestras infectadas por el patógeno. (Figura 7)

Figura 7. Muestras positivas para *Phytophthora* en las variedades de papa (*S. tuberosum*) evaluadas. Fuente: este estudio.



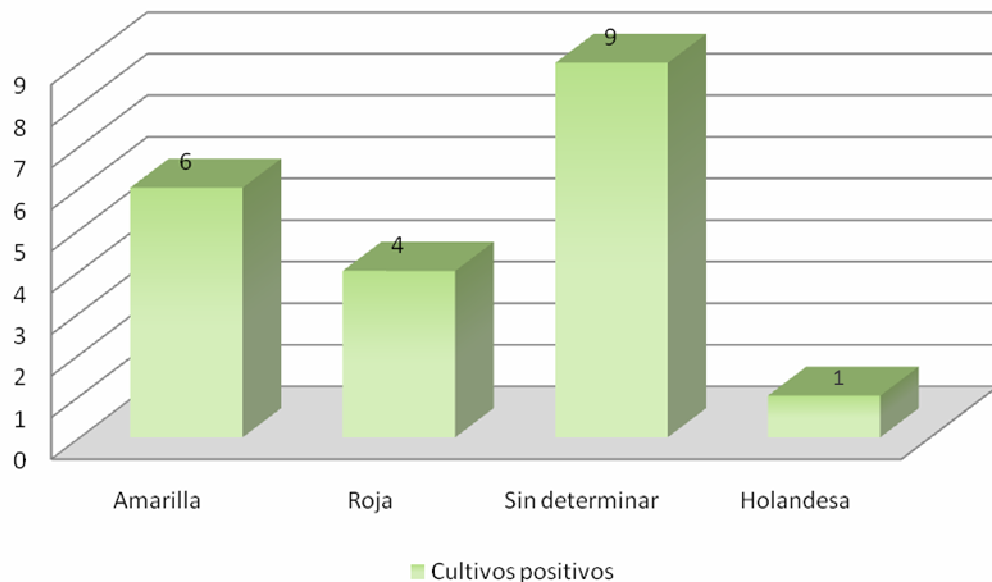
Por el contrario los resultados obtenidos en tomate de mesa (*S. lycopersicum*) señalan la presencia de dos poblaciones con características genéticas diferentes. El haplotipo Ib característico de las poblaciones de *P. infestans* presente en el 40% de las muestras y el haplotipo mitocondrial Ia en el 60% de las muestras analizadas (Anexo F). Esta última población es característica de *P. andina* reportada inicialmente en Ecuador (Oliva *et al.*, *en impresión*). Los perfiles de bandas después de la digestión para las dos poblaciones descritas se observan en el Anexo E. No se encontró relación de los haplotipos mencionados con alguna variedad en particular dado que se desconocía el tipo de variedad evaluada.

Para el caso de tomate de árbol (*S. betaceum*) fue evidente la presencia de poblaciones de *P. andina* en los cultivos analizados (haplotipo mitocondrial Ia). El 85% de las muestras evaluadas presentaron este haplotipo, lo que indica su predominancia en cultivos de *S. betaceum*. El 15% restante presentó un haplotipo mitocondrial no registrado previamente para este hospedante (Anexo E y F). El nuevo haplotipo presenta un perfil de bandas igual a 907-211pb para la región P1 y 720-350pb para la región P2, coincidiendo con lo

reportado. No obstante la región P4 después de ser digerida con la enzima *EcoRI* presenta dos bandas de aproximadamente 900 y 600pb adicionales a las bandas convencionales reportadas (394-361-209pb). Este haplotipo mitocondrial se codificó como *Hsb-I*

El patógeno se presentó con mayor frecuencia en la variedad roja o tamarillo que en la variedad común o amarilla. Un elevado número de muestras positivas se encontró en cultivos donde no fue posible conocer con exactitud la variedad. No se descarta la posibilidad de que estos cultivos pertenezcan a variedades diferentes a las mencionadas (Figura 8)¹.

Figura 8. Muestras positivas para *Phytophthora* en las variedades de tomate (*S. betaceum*) evaluadas. Fuente: este estudio



No se encontró relación de la presencia de los haplotipos mitocondriales encontrados con algún tipo de variedad en especial, las poblaciones se presentaron independientemente de la variedad evaluada.

En los cultivos de lulo evaluados, el número de muestras obtenidas fue pequeño con relación a los anteriores hospedantes. Sin embargo, se encontró una de las poblaciones con características no relacionadas a las dos especies de *Phytophthora* mencionadas anteriormente (*P. infestans* o *P. andina*) por lo que se catalogó dentro del grupo de *Phytophthora infestans sensu lato*. Este haplotipo mitocondrial presentó un perfil de bandas no reportado previamente igual a 907-211pb para la región P1; 641-350-203-147-140pb aproximadamente para la región P2 y 394-361-209pb para la región P4. Este haplotipo mitocondrial se codificó como *Hsq-I*. (Anexo E y F)

¹ Algunos de los morfotipos encontrados en *S. betaceum* no se pueden determinar como variedades específicas dado que se cultivan por selección de los agricultores de forma independiente y no se consideran variedades registradas.

La otra población encontrada en *S. quitoense* fue característico del haplotipo mitocondrial Ib para la región P2 y P4; sin embargo, no amplificó eficientemente para la región P1 por lo que no se pudo determinar si existía digestión o no del fragmento. Este haplotipo se codificó como *Hsq-II* dado que no se tiene registro para la región P1 (Anexo E y F)

Respecto a las variedades encontradas en *S. quitoense* fue muy difícil determinar la presencia del patógeno en un número representativo de cultivos. Sin embargo, se observó asociación de las poblaciones encontradas con las variedades reportadas para este hospedante. El haplotipo mitocondrial codificado como *Hsq-I* se encontró en la variedad *septentrional* (con espinas) en Nariño y el haplotipo mitocondrial *Hsq-II* se encontró en la variedad *quitoense* (sin espinas) en Putumayo (para cada haplotipo solo se registro una muestra positiva).

En *S. muricatum* solo se encontró una población de *P. infestans* asociada al haplotipo mitocondrial Ib coincidiendo con previos reportes realizados en Ecuador (Erselius et al., 1999; Gilchrist, 2001). No obstante, la ausencia de cultivos en *S. muricatum* en esta época del año solo permitió la evaluación de una sola muestra, esto puede subestimar la presencia de otros genotipos reportados para esta especie. (Anexo E y F). De las dos variedades encontradas en *S. muricatum* solo se encontraron síntomas de la enfermedad en la variedad 1 (para esta variedad solo se registro una muestra en el estudio) dada la ausencia de cultivos en la región.

Adicional a la información suministrada, los haplotipos encontrados para cada hospedante se ubicaron en un mapa con el fin de indicar su distribución en los dos departamentos². En el caso de *S. tuberosum* el haplotipo mitocondrial Ila fue registrado tanto para Nariño como para Putumayo siguiendo los patrones de distribución de los cultivos de papa en cada departamento (Figura 9). Para *S. phureja* el haplotipo mitocondrial Ila solo se encontró para Nariño dado que esta especie no se registró para Putumayo en esta época del año (Figura 10).

² Cada uno de los mapas obtenidos como resultado del estudio se muestran con mayor detalle en el Anexo E.

Figura 9. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en *S. tuberosum*. Fuente: este estudio.

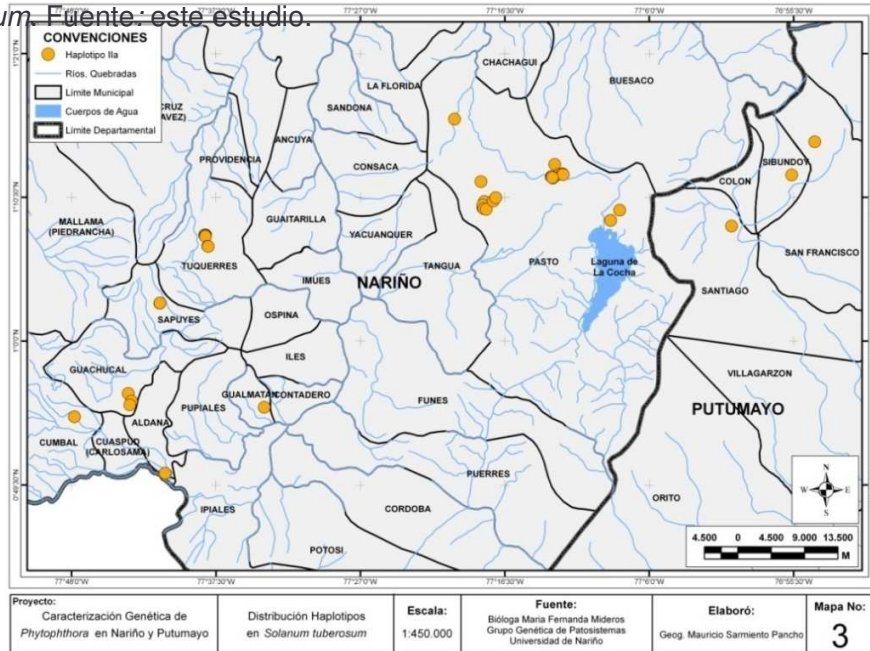
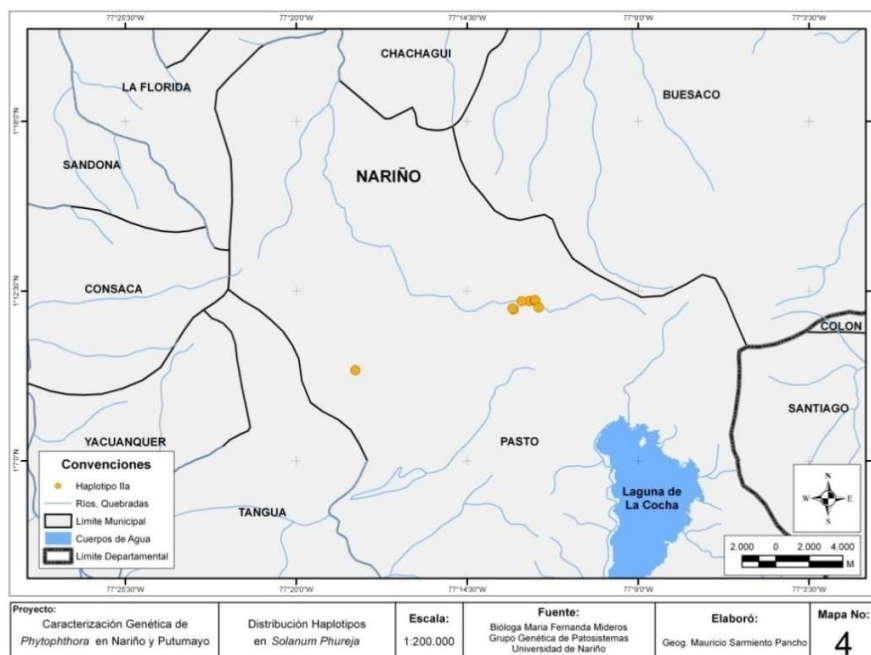
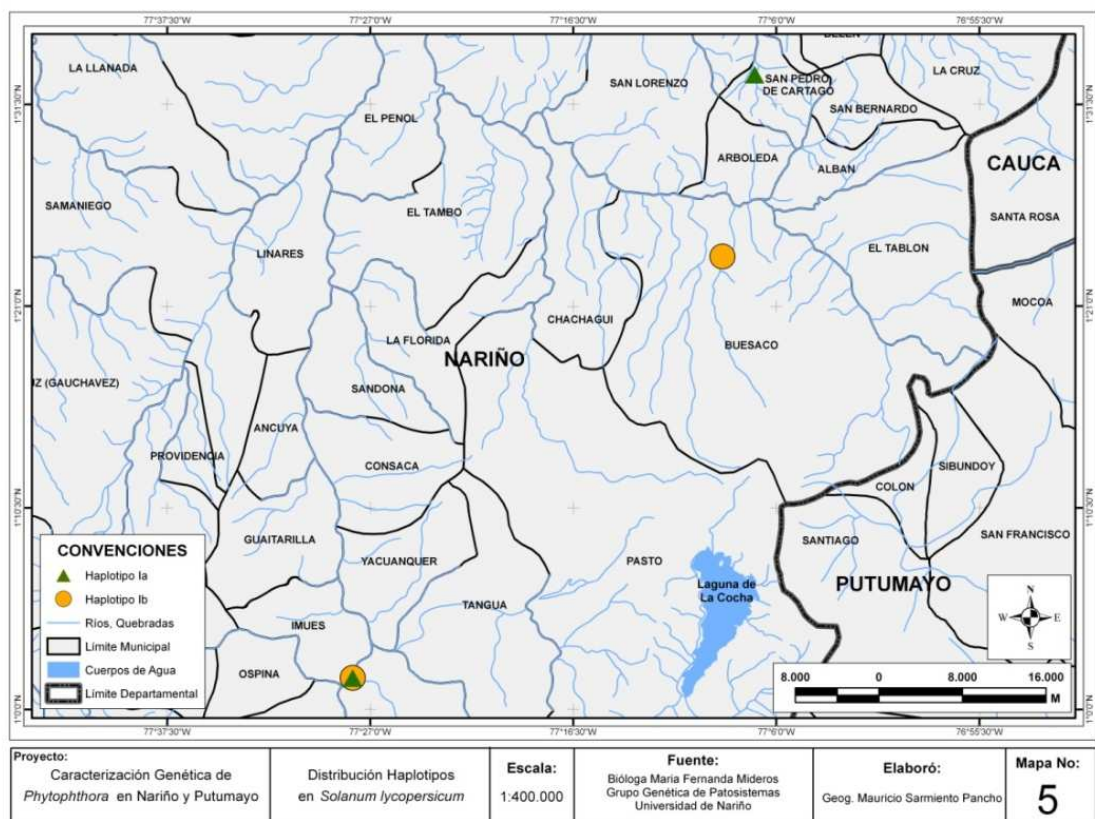


Figura 10. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en *S. phureja*. Fuente: este estudio.



Por el contrario, para *S. lycopersicum* la presencia de dos haplotipos mitocondriales (haplotipo mitocondrial Ib y haplotipo mitocondrial IIa) se observa de manera diferente para el norte y sur del departamento de Nariño. En el caso de la región norte la presencia de los dos haplotipos se reporta en municipios diferentes, el haplotipo Ib en Buesaco y el Haplotipo Ia en San Pedro de Cartago (La Unión); por el contrario para el municipio de Imués los dos haplotipos se encuentran en las mismas áreas de cultivo como se puede observar en la figura, esta situación requiere de especial atención al momento de establecer controles de la enfermedad (Figura 11)

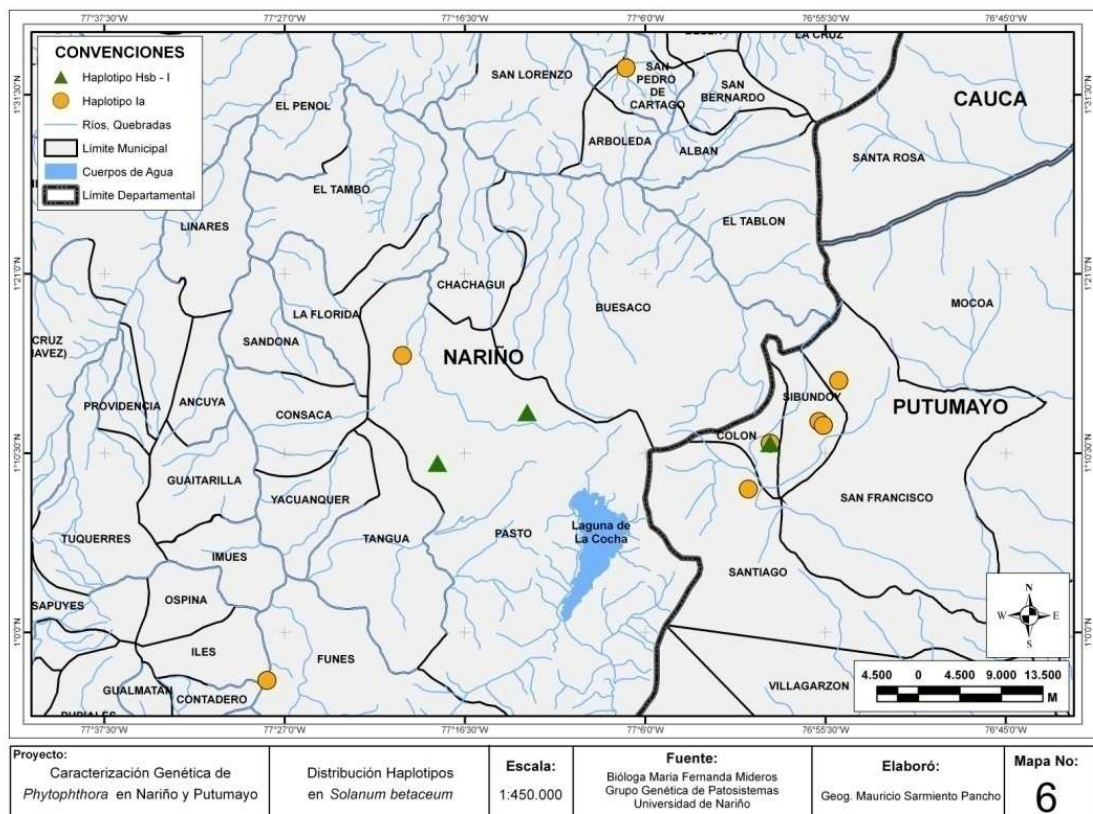
Figura 11. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en *S. lycopersicum*. Fuente: este estudio.



Para *S. betaceum* el haplotipo mitocondrial Ia fue encontrado en todas las áreas de cultivos muestreadas en Nariño y Putumayo. Los nuevos haplotipos codificado como *Hsb-1* fueron encontrados en el municipio de Pasto y en el Valle de Sibundoy. Aunque a diferencia de los que infectan a *S. lycopersicum* estas muestras no fueron obtenidas de los mismos cultivos no se puede descartar que una evaluación constante en este

hospedante muestra cultivos con ambos haplotipos mitocondriales lo que epidemiológicamente sería más representativo (Figura 12).

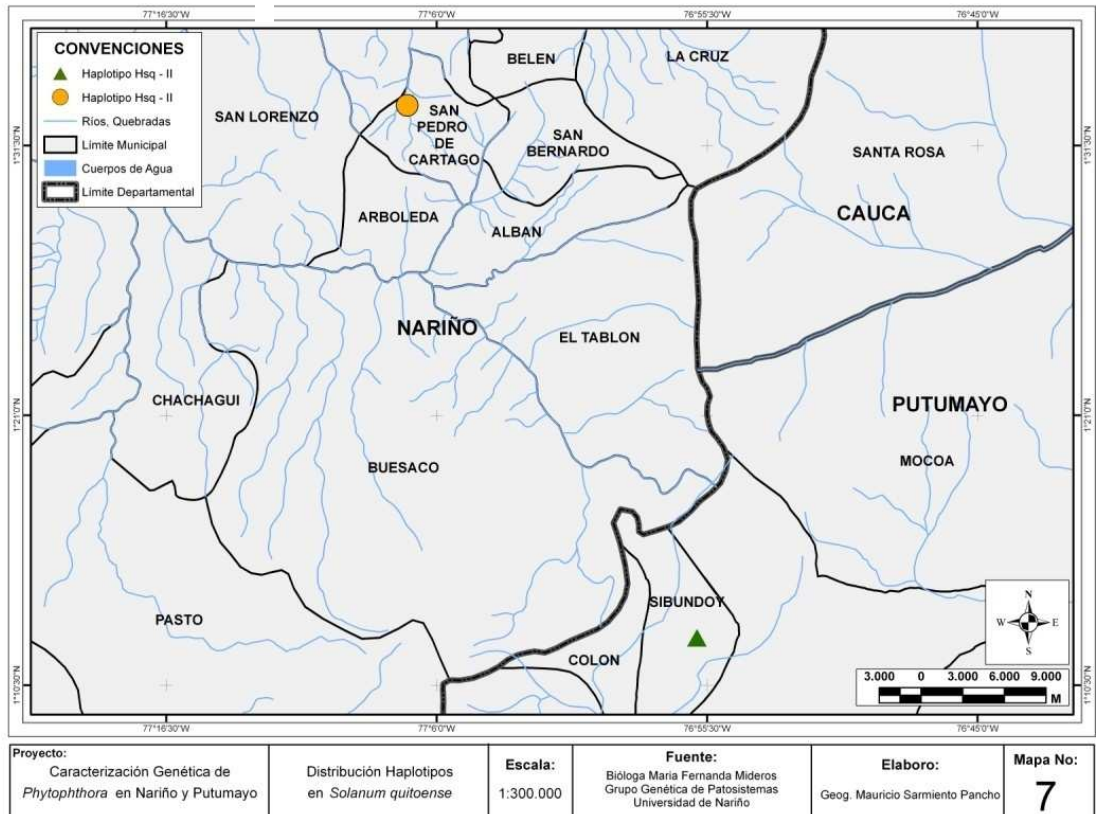
Figura 12. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en *S. betaceum*. Fuente: este estudio.



Para las muestras de *S. quitoense* y *S. muricatum* es muy difícil determinar un patrón de distribución claro dada la ausencia de un número representativo de muestras. No obstante para *S. quitoense* el mapa confirma claramente que el haplotipo mitocondrial *Hsq-I* se encuentra en el departamento de Putumayo y el haplotipo codificado como *Hsq-II* se encuentra en el departamento de Nariño (Figura 13). Para *S. muricatum* solo se registro un punto de muestreo con el haplotipo mitocondrial Ib en el valle de Sibundoy (Putumayo)³. Los resultados de estos dos grupos aun tienen que ser complementados con información adicional para analizar en detalle un posible patrón de distribución de los haplotipos asociados a estos hospedantes.

³ El mapa para este hospedero no se muestra dado que solo se encontró un registro para el departamento de Putumayo

Figura 13. Puntos de distribución de los haplotipos mitocondriales encontrados en *S. quitoense*. Fuente: este estudio.



5.4 DETERMINACIÓN DE LOS LINAJES CLONALES MEDIANTE HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES.

La determinación de los linajes clonales se realizó teniendo en cuenta el haplotipo mediante el perfil de bandas obtenido para las regiones P1, P2 y P4 en relación con el hospedante evaluado, obteniéndose tres posibles linajes clonales diferenciables dentro de las muestras: el linaje clonal US-1, EC-1 y EC-3. Igualmente se obtuvieron poblaciones sobre las cuales no fue posible determinar el linaje clonal dada la ausencia de reportes previos al respecto (Tabla 10)

Tabla 10. Linajes clonales encontrados para Nariño y Putumayo en diferentes especies de solanáceas mediante la determinación de haplotipos mitocondriales. Fuente: este estudio.

Hospedante evaluado	Haplotipo mitocondrial. PCR-RFLP	Posible linaje clonal
<i>S. tuberosum</i>	Ila	EC-1
<i>S. phureja</i>	Ila	EC-1
<i>S. lycopersicum</i>	Ib	US-1
<i>S. lycopersicum</i>	Ia	No determinado
<i>S. betaceum</i>	Ia	EC-3
<i>S. betaceum</i>	Hsb-I	No determinado
<i>S. quitoense</i>	Hsq-I	No determinado
<i>S. quitoense</i>	Hsq-II	No determinado
<i>S. muricatum</i>	Ib	US-1

5.5 ESTRUCTURA GENÉTICA DEL COMPLEJO *Phytophthora* EN NARIÑO Y PUTUMAYO.

A partir de la información obtenida se pudo determinar la estructura genética del complejo *Phytophthora* para los dos departamentos. Los resultados muestran que el patógeno se encuentra representado por más de una especie del género: 1) *P. infestans* registrada en hospedantes de *S. tuberosum*, *S. muricatum*, *S. quitoense* y *S. lycopersicum*. 2) *P. andina*, registrada tanto en *S. betaceum* como en *S. lycopersicum*. 3) Adicional a esto se reportan dos nuevas poblaciones que se catalogaron dentro del grupo de *Phytophthora infestans sensu lato* encontradas en *S. quitoense* y *S. betaceum* que aun no conocemos si pertenecen a variaciones de una sola especie o a especies diferentes del género (Tabla 11).

Tabla 11. Estructura genética del complejo *Phytophthora* para Nariño y Putumayo. Fuente. Este estudio.

	Posible linaje clonal RFLP	Hospedante	Haplotipo mitocondrial
<i>P. infestans</i>	US-1	<i>S. lycopersicum</i>	lb
		<i>S. muricatum</i>	lb
		<i>S. quitoense</i>	lb ^{a,b}
	EC-1	<i>S. tuberosum</i>	Ila
		<i>S. phureja</i>	Ila
<i>P. andina</i>	EC-3	<i>S. betaceum</i>	la
	No determinado	<i>S. lycopersicum</i>	la
<i>Phytophthora infestans sensu lato</i>	No determinado	<i>S. quitoense</i>	<i>Hsq-f</i>
	No determinado	<i>S. betaceum</i>	<i>Hsb-l</i>

^a Población similar al haplotipo lb para los primers F2R2 y F4-R4 codificado como *Hsq-II*; ^b Haplotipo mitocondrial encontrado para Nariño en la variedad *quitoense*; ^c Haplotipo mitocondrial encontrado para Putumayo en la variedad *septentrional*.

Estos resultados indican que muchas de las regiones incluidas en el estudio presentan más de un haplotipo confluyendo de forma natural como se muestra la figura 14, donde se presentan cuatro puntos de agrupación diferenciados claramente:

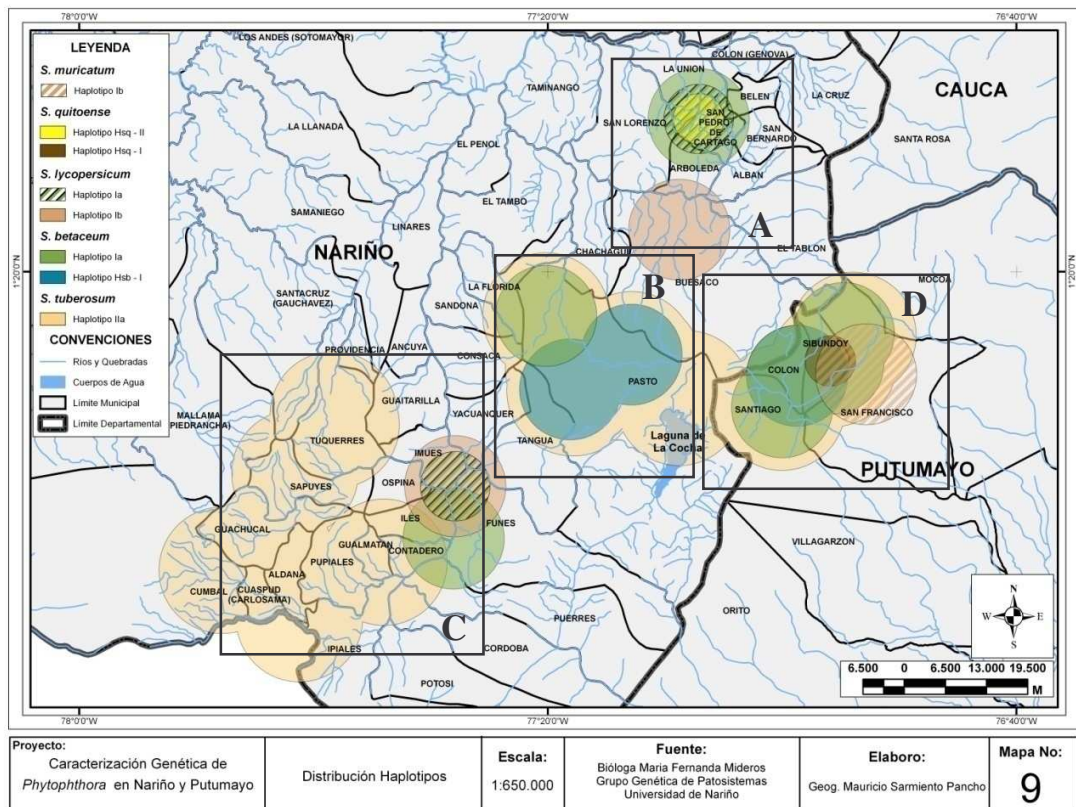
El cuadrante A ubicado al norte del departamento de Nariño muestra el solapamiento del haplotipo mitocondrial la reportado en tomate de árbol y tomate de mesa con el haplotipo *Hsq-II* reportado para *S. quitoense*. Para esta región los haplotipos de *S. lycopersicum* (haplotipo la y lb) no se encuentran en las mismas áreas de cultivo, el haplotipo la fue reportado para San Pedro de Cartago, a diferencia del haplotipo lb reportado en Buesaco. Sin embargo, dada la cercanía de las dos regiones es probable que el flujo de material permita la confluencia de estos haplotipos, lo que merece especial atención por sus repercusiones epidemiológicas y evolutivas.

El cuadrante B muestra la confluencia del haplotipo Ila encontrado en los cultivos de papa (*S. phureja* y *S. tuberosum*) junto con los haplotipos reportados en tomate (el haplotipo la y el haplotipo *Hsb-l*). En el caso de Tomate de árbol, a pesar de registrarse en localidades separadas, el mapa muestra claramente que los dos haplotipos pueden encontrarse en los mismos cultivos lo que puede contribuir de forma significativa al cambio de las poblaciones del patógeno. El cuadrante C muestra la distribución del haplotipo Ila sobre los principales municipios productores de *S. tuberosum*. De igual forma muestra la

confluencia del haplotipo Ib en *S. lycopersicum* con el haplotipo Ia de *S. betaceum* en los municipios de Imues, Iles y Funes donde los cultivos de tomate de mesa y tomate de árbol se cultivan en una misma área de forma natural.

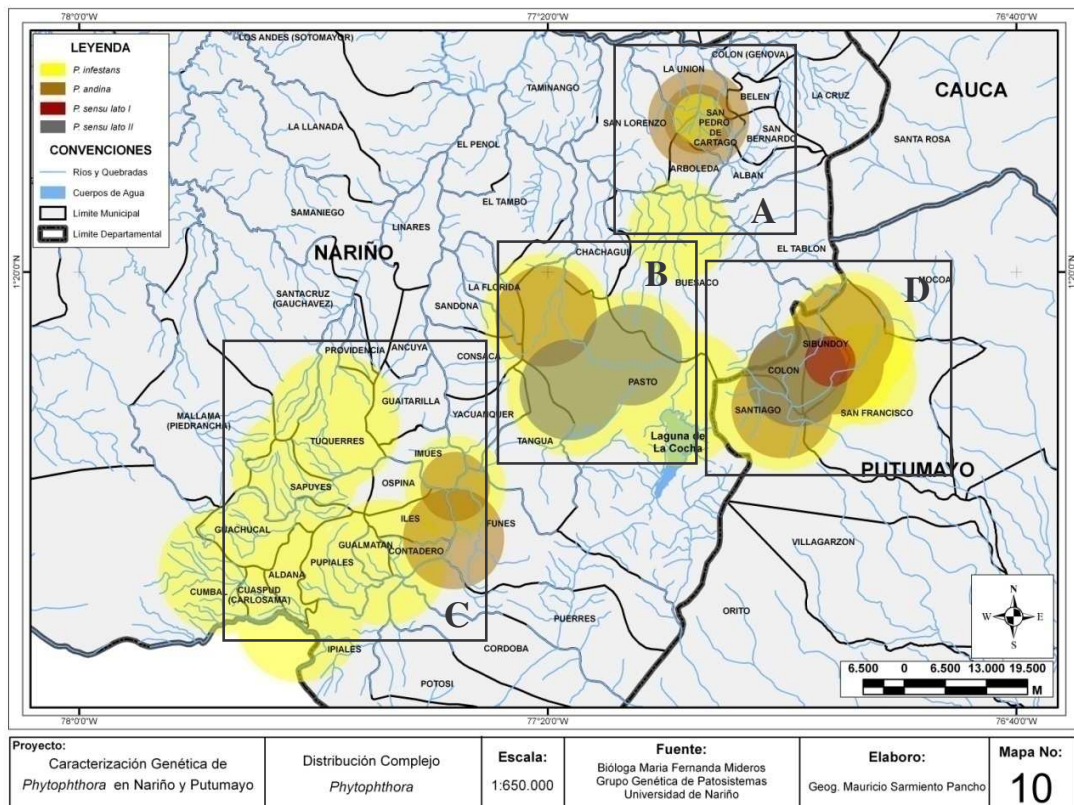
Por ultimo el cuadrante D ubicado para el Valle de Sibundoy (Putumayo) muestra la presencia de varios hospedantes en una misma área geográfica, en esta región es muy común encontrar cultivos de *S. tuberosum*, *S. betaceum*, *S. quitoense* y *S. muricatum*. Por lo que es muy fácil que confluyan los genotipos *Hsq-I* encontrado en *S. quitoense*, el haplotipo Ia y *Hsb-I* de *S. betaceum*, el haplotipo IIa de *S. tuberosum* y el haplotipo Ib de *S. muricatum*. Esta confluencia de genotipos resulta en una dinámica interesante para la región en términos de estructura genética del patógeno.

Figura 14. Distribución de Haplotipos de las diferentes especies del complejo *Phytophthora*. Fuente: este estudio.



Analizando la estructura poblacional de forma general se puede observar que la presencia de más de una especie puede ser común en Nariño y Putumayo (Figura 15). Dependiendo de las características de la región se puede encontrar dos o más poblaciones del complejo *Phytophthora* confluyendo de forma natural. En la región Norte y sur al parecer se encuentran coexistiendo de forma muy cercana *P. infestans* y *P. andina* (cuadrante A). Por el contrario se puede encontrar a *P. infestans*, *P. andina* y algunas poblaciones de *P. infestans sensu lato* en el Putumayo, donde las condiciones al parecer son las apropiadas para sostener esta diversidad (cuadrante D). De igual forma poblaciones de *P. infestans sensu lato*. *P. infestans* y *P. andina* se encuentran hacia el municipio de Pasto en Nariño (cuadrante B) y hacia la región sur del mismo departamento (cuadrante C).

Figura 15. Distribución de las diferentes especies del complejo *Phytophthora*. Fuente: este estudio.



DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DEL COMPLEJO *Phytophthora* A PARTIR DE LA DETERMINACIÓN DE HAPLOTIPOS MITOCONDRIALES.

n

Desde los primeros reportes de la enfermedad en 1876, *Phytophthora infestans* se ha considerado el agente causal de una de las enfermedades más letales y devastadoras de los cultivos de solanáceas, principalmente en papa (*S. tuberosum*) y tomate de mesa (*S. lycopersicum*), donde el patógeno ha generado fuertes impactos y problemas económicos en muchas regiones del mundo (Hirst & Stedman, 1960; Erwin & Ribeiro, 1996; Platt H., 1999). Sobre estas especies los estudios respecto a fisiología, patogenicidad y estructura genética de las poblaciones del patógeno han sido bastante frecuentes, todos ellos enfocados a establecer medidas de control eficientes de la enfermedad acordes con las necesidades de cada región (Erwin & Ribeiro, 1996; Kamoun *et al.*, 1999).

Resultado de este interés hasta el momento se tiene información detallada acerca del comportamiento del patógeno sobre papa y tomate en Norte América, Europa y Asia (Forbes *et al.*, 1998). Sin embargo, la dinámica de la enfermedad en zonas templadas es muy diferente a la dinámica encontrada en las regiones paperas y/o tomateras en los países tropicales (Jaramillo, 2003). En estos ecosistemas las condiciones bajo las cuales se cultivan solanáceas ofrecen características apropiadas para el mantenimiento constante de inóculo en campo favoreciendo notablemente el desarrollo continuo de la enfermedad (Páez, *et al.* 2005). Esta situación ha requerido un monitoreo constante de las poblaciones del patógeno que permita generar estrategias de control efectivas en respuesta a condiciones específicas de la zona donde se desarrolla la enfermedad.

Siguiendo con este monitoreo los resultados de esta investigación muestran que las poblaciones del patógeno presentes en cultivos de papa en Nariño y Putumayo evidentemente presentan una alta uniformidad. Tanto *S. tuberosum* como *S. phureja* presentaron poblaciones del patógeno con el haplotipo mitocondrial IIa, asociado al linaje clonal EC-1 (Forbes *et al.*, 1997), coincidiendo con lo reportado previamente para esta en aislamientos de *P. infestans* obtenidos de *S. phureja* (Lagos, 2002) y *S. tuberosum* (Lagos, 2002; Erazo y Ordoñez, 2005). De igual forma, este linaje clonal ha sido reportado reiteradamente en Ecuador desde finales de los años 90, donde se registró por primera vez atacando los cultivos de papa (Forbes *et al.*, 1997; Erselius *et al.*, 1999).

Previo a estos reportes, hacia la década de los 80s los estudios alrededor del mundo señalaban la presencia exclusiva de poblaciones de *P. infestans* asociadas al linaje clonal US-1 en cultivos de papa (Goodwin *et al.*, 1994). Sin embargo, nuevas variaciones de los genotipos alrededor de todo el mundo disminuyeron significativamente las poblaciones de este linaje clonal (Goodwin *et al.*, 1992), llegando a ser desplazado completamente de los cultivos de papa. Este fenómeno ha sido ampliamente documentado en Europa (Spielman *et al.*, 1991; Drenth *et al.*, 1994; Sujkowski *et al.*, 1994), Asia (Koh *et al.*, 1994) y Sur América (Fry *et al.*, 1992; Forbes *et al.*, 1997), donde el genotipo EC-1 desplazó completamente las poblaciones del genotipo US-1 (Forbes *et al.*, 1997), el cual es muy

común es hospedantes de la sección *Petota* (Forbes *et al.*, 1997), siendo este el evento migratorio mas reportado hasta el momento en cultivos de papa para los Andes del Ecuador y Perú (Páez *et al.*, 2005).

Para Nariño la presencia del genotipo US-1 fue registrado por ultima vez en el 2002 por Lagos (2002) posterior a esta fecha los monitoreos en *S. tuberosum* indican que las poblaciones asociadas a este linaje han sido desplazadas completamente por el linaje clonal EC-1 como resultado de la fuerte presión de selección que existe sobre el patógeno por parte de los agricultores y el manejo químico han favorecido a poblaciones más eficientes capaces de soportar estas presiones. En el caso del linaje clonal EC-1 ciertas características particulares como la resistencia a fungicidas de uso convencional (principalmente metalaxyl) y elevados niveles de agresividad le han permitido una mayor eficiencia de infección en cultivos de papa a diferencia del linaje clonal US-1 (Forbes *et al.*, 1997; Miller & Johnson, 2000).

En el norte de Colombia y Venezuela la presencia del genotipo EC-1 ha sido evidente durante la última década (Forbes *et al.*, 1997; Oyarzun *et al.*, 1998; Gilchrist, 2001; Perez *et al.*, 2001; Jaramillo, 2003; Lagos, 2002; Eraso & Ordoñez, 2005). Al parecer el transporte de tubérculo de papa introducido para semilla o consumo humano a largas distancias es la razón principal que explica la presencia del genotipo EC-1 en estas regiones (Fry *et al.*, 1993). Evaluaciones realizadas en Antioquia y Norte de Santander señalan la presencia del haplotipo IIa en mayor frecuencia que el haplotipo Ib, suponiendo una posible transición del linaje US-1 hacia EC-1 (Jaramillo, 2003). Este fenómeno migratorio probablemente responde al transporte de semilla desde Ecuador, donde existe un amplio registro de la presencia del linaje clonal EC-1. Eventos migratorios similares se han observado en Perú donde las poblaciones del patógeno han cambiado drásticamente desde mediados de los 1980s con migraciones de cepas provenientes de Ecuador (Pérez *et al.*, 2001).

De las variedades de *S. tuberosum* incluidas en el estudio, se encontró la presencia de *P. infestans* con más frecuencia en la variedad *Diacol Capiro* seguida por la variedad roja. Situación que era de esperarse dada la alta susceptibilidad de estas variedades al ataque de *P. infestans* (Núñez, 1999). Para la variedad *Diacol Capiro* es bastante documentada su susceptibilidad a los ataques de *P. infestans* en Colombia como en Ecuador siendo igual de susceptible que las variedades *Parda pastusa*, *ICA Nevada* y *Tuquerreña* (Burbano *et al.*, 2007). Solo en Venezuela se ha considerado esta variedad moderadamente resistente (Núñez, 1999). Por el contrario no se evidenció la enfermedad en la variedad *Parda mejorada*, *Morasurco* y *Carizo*, indicando que aun existe cierto grado de resistencia al patógeno. No obstante, un monitoreo constante de estas variedades puede dar indicios claves que señalen la presencia de poblaciones del patógeno capaces de evadir la resistencia y atacar masivamente estos cultivos.

A diferencia de *S. tuberosum*, en tomate de mesa (*S. lycopersicum*) no se encontró asociación del hospedante a un solo genotipo en particular. Los resultados señalan la presencia de dos poblaciones diferentes del patógeno atacando estos cultivos, una de ellas perteneciente al linaje clonal US-1 (haplotipo mitocondrial Ib), y la otra correspondiente a una nueva población previamente no reportada para este hospedante con un perfil de bandas similar al encontrado en el haplotipo mitocondrial Ia, el cual solo ha sido reportado en *S. betaceum* (Adler *et al.*, 2004)

Pese al elevado interés que ha existido, las publicaciones en *S. lycopersicum* indican que la dinámica del patógeno en este hospedante aun no es clara (Erselius *et al.*, 2000). Hasta el momento los estudios de caracterización han reportado la presencia de dos linajes atacando a este hospedante: el linaje US-1 y el linaje EC-1. En el caso del linaje clonal US-1, estudios realizados en Colombia (Jaramillo 2003), Ecuador (Oyarzun *et al.*, 1998) y Brasil (Reis *et al.*, 2003) indican que este linaje se asocia de forma casi exclusiva a *S. lycopersicum*, donde aun se mantiene de forma efectiva a diferencia de lo que ocurre en *S. tuberosum* (Jaramillo, 2003). Al parecer existe una fuerte relación patógeno-hospedante dada la ausencia de fuertes presiones de selección sobre dichos aislamientos producto de las condiciones agronómicas y ecológicas que presentan sus hospedantes, aunque estas afirmaciones no se pueden considerar concluyentes (Jaramillo, 2003).

A diferencia de estudios previos realizados para Ecuador (Oyarzun *et al.*, 1998) y Colombia (Eraso & Ordoñez, 2005), el linaje clonal EC-1 no se encontró asociado a ninguna de las muestras provenientes de *S. lycopersicum* evaluadas en este estudio. Esta situación supone que la presencia de este linaje clonal atacando tomate de mesa responde a un evento aislado y no representa la estructura poblacional real del patógeno sobre este hospedante, corroborando las observaciones reportadas previamente por Oyarzun *et al.* (1998) quienes señalan que el linaje clonal EC-1 encontrado en tomate de mesa para Ecuador probablemente corresponde a un aislado débil patogénicamente encontrado por azar, es decir que *S. lycopersicum* no es hospedante esencial del genotipo EC-1 y solo actúa como hospedante alternativo bajo determinadas condiciones.

El mismo autor corroboró esta afirmación con pruebas de agresividad donde encontró que el aislamiento obtenido del linaje clonal EC-1 fue más agresivo en papa que en tomate, y menos agresivo en tomate que el genotipo US-1 (Oyarzun *et al.* 1998). Esto ha permitido concluir que además de existir una alta especificidad entre el linaje clonal US-1 y *S. lycopersicum* otros genotipos potenciales solo desarrollan infecciones oportunistas asociadas a eventos aislados. Esta misma situación también ha sido reportada en otras especies de solanáceas (*S. muricatum* y el complejo *Anarrhichomenum*) donde no se puede afirmar que los nuevos genotipos encontrados representen linajes clonales completamente adaptados (Chacon, 2007).

Sumada a esta información, los resultados de este estudio indican que otra población se encuentra atacando los cultivos de tomate de mesa en el sur de Colombia. Esta población presenta perfiles de restricción similares al haplotipo mitocondrial la exclusivo de tomate de árbol (Adler *et al.*, 2002). Esta población corresponde a una especie diferente a *P. infestans*, conocida como *P. andina* (ver discusión en *S. betaceum*), la cual se puede encontrar igualmente en *S. quitoense* y *S. muricatum* (Oliva *et al.*, *en impresión*). No existen estudios que asocien la presencia de este haplotipo a *S. lycopersicum*, siendo este el primer reporte donde se señala que el haplotipo mitocondrial la puede encontrarse atacando este hospedante, igualmente sería el primer reporte de la presencia de *P. andina* en estos cultivos.

Aunque no se tiene clara la adaptabilidad de este haplotipo mitocondrial en *S. lycopersicum*, se puede considerar que estas poblaciones típicas de *S. betaceum* presentan un comportamiento similar al descrito previamente para el linaje clonal EC-1 en tomate de mesa. Es decir, utilizan esporádicamente a *S. lycopersicum* como hospedante

alternativo donde no es altamente agresivo. Es claro que para estas regiones los cultivos de tomate de árbol y tomate de mesa se desarrollan bajo las mismas condiciones y es muy común encontrarlos coexistiendo en una misma localidad e incluso en una misma huerta, por lo que es de esperarse que en zonas de transición se compartan genotipos en determinados ciclos infectivos de la enfermedad (Erselius *et al.*, 2000; Eraso & Ordoñez, 2005). Un monitoreo continuo del patógeno puede descartar o no la posibilidad de que este haplotipo mitocondrial corresponda a una población oportunista que ataque esporádicamente a estos cultivos.

La presencia de *P. andina* en otros cultivos diferentes a su hospedante primario ha sido encontrada en otros estudios. Por ejemplo, un pequeño número de aislamientos de *P. andina* se encontraron atacando especies de la sección *Basarthrum* (aislamientos A2 encontrados en *S. muricatum*) o especies de la sección *Petota* (aislamientos A2 encontrados en *S. colombianum*, *S. tuberosum*, y *S. phureja*), aun no se reconoce si esto representa un caso real de adaptación sobre estos hospedantes (Chacon, 2007)

Al igual que en *S. lycopersicum*, los resultados en *S. betaceum* arrojaron información interesante respecto a las características de las poblaciones del patógeno. Las muestras de *S. betaceum* evaluadas están relacionadas al linaje clonal EC-3, coincidiendo con los reportes realizados por Erazo y Ordoñez (2005) para Putumayo. Actualmente este haplotipo se asocia a una nueva especie de *Phytophthora* conocida como *P. andina* (Oliva *et al.*, *en impresión*). En Ecuador ya se tenían indicios sobre la presencia de esta especie atacando algunos cultivos de solanáceas (Ordoñez *et al.*, 2000; Chacon, 2007), en la actualidad se ha confirmado su presencia con síntomas de la enfermedad similares a los generados por *P. infestans* en *S. betaceum*, *S. quitoense*, *S. hispidum* y especies del complejo *Anarrhichomenum* (donde también es común encontrarla en tallos) (Oliva *et al.*, *en impresión*).

La presencia de esta y otras especies con características patogénicas cambian los conceptos que se han manejado hasta el momento para controlar la enfermedad y los mecanismos que han explicado los patrones evolutivos del patógeno. Aun no es claro el origen *P. andina* en estas regiones; sin embargo se conoce la fuerte relación entre *P. infestans* y *P. andina* (Gomez-Alpizar *et al.* 2008; Kroon *et al.* 2004; Oliva *et al.* *en impresión*). Las suposiciones al respecto indican que posibles eventos migratorios desde México no reportados previamente explican la presencia del patógeno en Sur América, aun así el hecho de que *P. andina* solo haya sido encontrada en los Andes ofrece un nuevo punto de referencia para suponer que su origen es Sur americano al igual que *P. infestans* (Adler *et al.*, 2004)

Pese a que el haplotipo la fue el predominante en cultivos de *S. betaceum* no es el único genotipo presente en este hospedante. La presencia de un haplotipo mitocondrial diferente a los reportados indica que las poblaciones pueden llegar a ser mucho más diversas que lo reportado anteriormente para esta región por Lagos (2002), y Erazo y Ordoñez, (2005). Según Adler., *et al* (2002), esta diversidad puede llegar a ser evidente en especies no tuberíferas, siendo bastante alta a nivel intra e interespecifico a diferencia de las especies de *Solanum* tuberíferas (sección *Petota*), las cuales son genéticamente muy similares y presentan un mínimo grado de polimorfismo.

Este haplotipo constituye el primer reporte de la presencia de una nueva población con características diferentes a las conocidas previamente atacando cultivos de *S. betaceum*. Si bien aun no se puede afirmar con exactitud si la población encontrada representa a una nueva especie de *Phytophthora* atacando estos cultivos o a una variación de las poblaciones existentes, es posible suponer a partir de las observaciones realizadas que la presencia de este haplotipo mitocondrial se encuentra ligada a la estructura poblacional del patógeno para la región. El hecho de encontrarse directamente en tejidos infectados en Putumayo (muestreados en este estudio) y aislamientos provenientes de Nariño mantenidos durante los últimos años en la Colección de *P. Infestans* de la Universidad de Nariño da indicios claros de que la presencia de esta población sobre el hospedante no corresponde a un evento aleatorio por el contrario se mantiene constante en el tiempo.

Adicional a esta información ensayos de agresividad con los aislamientos que presentaron un nuevo haplotipo mitocondrial realizados por el grupo e investigación Genética de patosistemas (GENPAT) muestran que estas poblaciones son igual o más agresivos que algunas cepas del linaje clonal EC-3 obtenidas del mismo hospedante (Revelo *et al.*, 2007), dando evidencias de la adaptabilidad del patógeno al hospedante. La presencia de nuevos genotipos ha estado constantemente asociado a una elevada agresividad, resistencia a fungicidas y mayor adaptabilidad frente a determinado hospedante (Jaramillo, 2003), que incrementa la probabilidad de aparición de posibles epidemias (Castaño, 1996). Esto representa epidemiológicamente un riesgo para los cultivos de tomate de árbol, y ha sido observado constantemente en las zonas muestreadas, principalmente Putumayo donde el efecto devastador del patógeno destruye plantaciones del cultivo en poco tiempo (Anexo D).

Los resultados obtenidos en el estudio igualmente muestran los primeros reportes de la presencia de especies de *Phytophthora* en cultivos de lulo para Nariño y Putumayo. Dada la importancia de los cultivos de lulo y su amplia distribución, estos constituyen uno de los cultivos más representativos en Colombia (Fory, 2005); no obstante, su cultivo representa una de la principales fuentes de inóculo para las poblaciones de *Phytophthora* donde ha generado epidemias devastadoras. Hasta el momento solo se conoce la presencia de *P. andina* en especies comerciales de *S. quitoense* en Ecuador (Oliva *et al.*, *en impresión*). Sin embargo, los esfuerzos encaminados al conocimiento de las poblaciones de *Phytophthora* que atacan a este hospedante realizados en este estudio indican que existen poblaciones diferentes a las conocidas previamente atacando los cultivos en esta región, confirmando lo expuesto por Oliva *et al.*, (*en impresión*).

Una de las poblaciones encontradas asociadas a lulo presentan semejanza al haplotipo mitocondrial Ib, que podría representar una población aislada del linaje US-1, aunque aun requiere confirmarse (Oliva R., *comunicación personal*). Por el contrario el haplotipo mitocondrial Hsq-1 presenta un perfil de bandas no reportado previamente en otros estudios, sus características atípicas pueden asociarse eventualmente a una nueva especie de *Phytophthora*. Aun no se puede asegurar a que especie pertenece este haplotipo mitocondrial, sin embargo, los perfiles obtenidos no corresponden a los reportados por Oliva *et al* (2005) quienes son los únicos que han realizado trabajos en este hospedante.

Por ultimo, en el caso de *S. muricatum* la única muestra analizada en este estudio se obtuvo de una planta aislada en el municipio de Sibundoy, el cual presentó haplotipo

mitocondrial Ib (Linaje clonal US-1), de forma similar a lo reportado para la especie en Ecuador y Colombia donde el linaje clonal representativo es el US-1 (Oyarzun et al., 1998; Jaramillo, 2003). Al igual que lo reportado para *S. lycopersicum*, la relación del linaje clonal US-1 con *S. muricatum* se asocia a una baja presión de selección que favorece notablemente al linaje clonal (Jaramillo, 2003). Sin embargo, la ausencia de cultivos establecidos de *S. muricatum* no permitió un muestro intensivo del hospedante en las localidades visitadas por lo que no se descarta en estudios posteriores la probabilidad de encontrar linajes clonales diferentes, tal como ha ocurrido en Ecuador con el linaje clonal EC-2 (Ordoñez et al., 2000 (Adler et al., 2002; Chacon, 2007).

Dentro de los estudios realizados en Colombia para este hospedante, *S. muricatum* ha presentado un comportamiento particular. Raigosa y Amaya (2006) reportan un perfil de bandas para *S. muricatum* no reportado previamente en Colombia (1118, 1078-230, 361-394-209, para los primers F1-R1, F3-R3 y F4-R4 sin amplificación para el primer F2-R2). Aunque el mismo autor señala que los datos no son concluyentes este es el único reporte en el país sobre esta especie en las últimas décadas. Estudios más profundos al respecto pueden revelar la presencia de poblaciones diferentes del patógeno, incluyendo el linaje clonal EC-2.

Pese a evaluarse dos variedades diferentes de pepino de agua solo fue posible identificar síntomas asociados a la enfermedad en una de ellas. Observaciones realizadas en el Ecuador indican que este comportamiento es común en campo, dos especies o variedades (en este caso) pueden crecer próximas pero solo una de ellas presenta la enfermedad existiendo probablemente diferencia en las reacciones de virulencia, como se ha visto en algunas poblaciones silvestres (Oyarzun et al 1998). Esta observación puede ser interesante en la búsqueda de especies resistentes a la enfermedad propias de estos ecosistemas.

En este estudio, las especies comerciales de *Capsicum spp.* y *Physalis spp.* no se encontraron asociadas a alguna de las especies del complejo *Phytophthora*. Las muestras obtenidas no presentaron síntomas de la enfermedad, a diferencia de estudios previos realizados en Colombia donde se han obtenido aislamientos con haplotipo mitocondrial IIa tanto en *Capsicum spp* (Marin & Mira, 1998; León, 2004), como de *Physalis spp* (León, 2004). La ausencia del patógeno para estos hospedantes se explica por el muestreo de plantas aisladas donde no existen ambientes húmedos apropiados para el crecimiento, diseminación y mantenimiento de las poblaciones del patógeno (Chacon, 2007). Igualmente no se pudo descartar que el patógeno se encuentre de forma esporádica sobre estos hospedantes (tal como ocurre en especies silvestres) a diferencia de cultivos como papa y tomate donde la enfermedad es constante todo el año (Adler et al., 2004). Es necesaria la evaluación de estos hospedantes en épocas de siembra para corroborar la ausencia de la enfermedad.

En especies como *S. sibundoyensis* se observó un comportamiento particular. A pesar de encontrarse cercano a cultivos infectados por el patógeno, ninguna de las muestras evaluadas presentó síntomas de la enfermedad. Posiblemente esta especie presente genes de resistencia de forma similar como ha sido reportado para muchas de las especies no cultivadas que muestran resistencia al patógeno (Erselius & Forbes, 2005). En este tipo de hospedantes se puede pensar que existe una marcada coevolución con especies del complejo *Phytophthora*, donde la resistencia del hospedante cumple un

papel fundamental permitiendo completar los ciclos de vida tanto del patógeno como de la planta (Niedehauser, 1991). Producto de esta coevolución mucha de esta resistencia es de tipo horizontal como se ha observado en *S. demissum*, especie que ha sido usada ampliamente en programas de mejoramiento genético utilizando sus genes en más del 50 % de los cultivares de papa con el fin de generar resistencia a la enfermedad (Losoya-Saldaña *et al.*, 2006).

Este hallazgo puede ser significativo en el desarrollo de programas de mejoramiento genético que sumado al conocimiento que se tiene sobre la estructura poblacional del patógeno permitiría obtener variedades de *S. betaceum* resistentes a *Phytophthora* que a largo plazo disminuiría el uso de fungicidas nocivos para la salud y para el medio ambiente permitiendo además un mejor aprovechamiento de los recursos genéticos presentes en esta región.

ESTRUCTURA GENÉTICA DEL COMPLEJO *Phytophthora* EN NARIÑO Y PUTUMAYO.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de la estructura poblacional arrojan información valiosa sobre el complejo *Phytophthora* para Nariño y Putumayo. La evaluación de hospedantes cultivables como *S. betaceum*, *S. muricatum*, *S. quitoense* o algún tipo de especie silvestre, muestra una dinámica y un comportamiento de las poblaciones de *Phytophthora* diferente a lo establecido en la actualidad basado en papa y tomate (Erselius *et al.*, 1999). Pese a la importancia comercial de estos cultivos y a la diversidad de especies de solanáceas, poco se conoce acerca del papel de estos hospedantes sobre las poblaciones del patógeno (Chacon, 2007; Erselius & Forbes, 2005), lo que ha dado una idea equivocada respecto a la biología y la historia de vida del patógeno en el campo (Adler *et al.*, 2002).

Es notable que la diversidad encontrada para el complejo *Phytophthora* en este estudio es muy elevada. La presencia de cuatro nuevos haplotipos mitocondriales no reportados previamente para las poblaciones de complejo *Phytophthora* se asocia a dos razones primordiales: Primero: la caracterización de poblaciones del patógeno a muestras de ADN obtenido directamente de tejidos infectados. Los resultados obtenidos en este estudio utilizando determinación directa de haplotipos mitocondriales en tejidos frescos (Griffith y Shaw, 1998), demostraron ser excelentes al momento de conocer la estructura genética del patógeno. La técnica permitió analizar un número elevado de muestras sin previo aislamiento del microorganismo lo que simplifica el monitoreo y diagnóstico de la enfermedad a diferencia del método convencional (Henson & French, 1993; Trout *et al.*, 1997; León, 2004)

Los estudios llevados a cabo para caracterizar las poblaciones del patógeno indican reiteradamente el bajo éxito, excesivo gasto de tiempo y la dificultad del análisis de las poblaciones de *P. infestans* a partir de cultivos en laboratorio (Nieplod & Schöber-Butin, 1995; Trout *et al.*, 1997; León, 2004; Eraso & Ordoñez, 2005). Muchos de los métodos utilizados presentan una baja eficiencia de aislamiento siendo altamente susceptibles a la contaminación con bacterias u hongos como *Fusarium* y *Phoma sp* (León, 2004). Contrarrestando esta situación la sensibilidad y versatilidad de técnicas moleculares ofrecen ciertas ventajas que permiten la detección del patógeno usando pequeñas cantidades de micelio (Lee, 1993; Henson & French, 1993) o en ausencia de estructuras

típicas del microorganismo (Wansgsomboondee & Ristaino, 2002) como ocurre generalmente en poblaciones asociadas a *S. quitoense*. Más aun permite la identificación de diferentes especies de *Phytophthora* cuando nos enfrentamos a un complejo de especies como el encontrado en este estudio (Nieplod & Schöber-Butin, 1995; Tooley *et al.*, 1997) .

Segundo, la inclusión de hospedantes cultivables diferentes a los convencionales, lo que incrementa notablemente la probabilidad de encontrar nuevos genotipos (Adler *et al.*, 2002). Cerca de 100 hospedantes potenciales de *P. infestans* han sido registrados a nivel mundial, de los cuales la mayor parte de tipo silvestre y cultivable confluyen de forma natural en las regiones Andinas y tropicales de Sur América consecuencia de la variedad de ambientes y microclimas presentes en estas regiones (Chacon, 2007; Erselius & Forbes, 2005). Esta amplia diversidad de hospedantes potenciales muestra una dependencia directa con la variabilidad del patógeno resultado de la cantidad de relaciones que el patógeno puede establecer con diferentes especies de solanáceas (Chacon, 2007).

Esta situación ha motivado el interés por el estudio de una gran variedad de hospedantes. Sin embargo, los pocos estudios al respecto se han realizado principalmente en Ecuador arrojando resultados interesantes. Al menos 15 especies de solanáceas han sido establecidas como hospedantes naturales del patógeno desarrollando síntomas similares a los del tizón tardío (Adler *et al.*, 2004). Se ha determinado una amplia diversidad del patógeno convirtiendo a Ecuador en el país donde se reporta la mayor diversidad del patógeno a diferencia de otros países Andinos (Adler *et al.*, 2004). Un ejemplo de ello son los estudios realizados por Oyarzun *et al.*, 1997 y Ordoñez., *et al* (2000) quienes reportan por primera vez la presencia de un nuevo genotipo conocido como el linaje clonal EC-2, con tipo de apareamiento A2 y linaje clonal Ic (un tipo inusual de haplotipo mitocondrial) aislado de *S. brevifolium* y *S. tetrapetalum* (Ordoñez *et al.*, 2000) previamente no reportado en otra región del mundo; y los estudios de Adler., *et al* (2002) donde se demuestra la presencia de los dos tipos de apareamiento en *S. muticatum* (Adler *et al.*, 2002).

Dada la cercanía con Ecuador y la similaridad de ecosistemas entre los dos países es de esperarse una situación similar a la observada en Ecuador en muchas regiones de Colombia. La diversidad del patógeno en Colombia puede ser mucho más elevada de lo que se conoce actualmente (Jaramillo, 2003). Se puede considerar aun más esta situación si se tiene en cuenta la amplia diversidad de especies de solanáceas del país que pueden actuar naturalmente como hospederas de las poblaciones de *Phytophthora*.

Adicional a estos estudios, la información suministrada en el documento permite fortalecer la idea planteada por diversos autores quienes consideran a los Andes sur americanos el "hot spot" (lugar de amplia variabilidad genética y alta presión de selección) respecto a la diversidad mitocondrial y la evolución de nuevas especies de *Phytophthora* (Ordoñez *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2002; Kroon *et al.*, 2004; Avila-Adame *et al.*, 2006; Gómez-Alpizar *et al.*, 2007). Aun no se conoce en su totalidad la magnitud de esta diversidad, pero evidencias usando DNA nuclear y genes mitocondriales dan indicios de los elevados niveles que puede alcanzar en las poblaciones andinas (Gómez-Alpizar *et al.*, 2007). Las condiciones apropiadas para el desarrollo de nuevas variantes génicas en ecosistemas tropicales (Chacon, 2007) ratifican la idea de la evolución constante de linajes y/o

especies que permiten la aparición de inusuales tipos de DNA mitocondrial (Avila-Adame et al., 2006). Estos aportes igualmente intensifican las evidencias que señalan un posible origen de *P. infestans* en los Andes Sur Americanos (Abad & Abad, 1997; Gómez-Alpizar et al., 2007)

La estructura genética se analizó igualmente teniendo en cuenta la distribución geográfica de cada uno de los haplotipo encontrados para cada una de las especies del género. A nivel general en Ecuador se han establecido tres factores que permiten entender la subestructuración de las poblaciones del patógeno: el aislamiento geográfico, la adaptación a ciertas condiciones climáticas y la especificidad de hospedante (Chacon, 2007), siendo éste último de gran importancia en ciertos linajes clonales dado que es el mecanismo por el cual se establece un aislamiento genético y el rango de hospedantes que ataca un genotipo determinado (Chacon, 2007).

En el caso de *P. infestans* los dos haplotipos encontrados para esta especie presentaron diferencias en la distribución, el haplotipo mitocondrial IIa (linaje clonal EC-1) solo se encuentra en la región de los Andes donde se localizan las principales áreas de cultivo de *S. tuberosum* (CEVIPAPA, 2004) (Ver Fig. 9; Anexo G), a diferencia del haplotipo mitocondrial Ib que se distribuye en varias localidades tanto en Nariño como en Putumayo (Ver Fig. 11 y 13; Anexo G).

No se puede afirmar con certeza las razones que determinan la distribución del haplotipo mitocondrial IIa; sin embargo, es mucho más probable que la adaptación a condiciones climáticas presente una mayor influencia en la distribución de este haplotipo a diferencia de la especificidad de hospedante o el aislamiento geográfico. Los estudios de patogenicidad no han encontrado evidencias concretas que señalen la existencia de especificidad del haplotipo mitocondrial IIa en hospedantes de la sección *Petota* (Fry et al., 1991; Goodwin et al., 1995; Legard et al., 1995; Garry et al., 2001; Eraso & Ordoñez, 2005; Chacon, 2007). Igualmente, dado que *P. infestans* no presenta limitadas capacidades de dispersión el aislamiento geográfico no se ha considerado una limitante en la distribución del patógeno. En zonas de transición donde se cultivan varias especies de solanáceas las poblaciones del patógeno se pueden encontrar en varios hospedantes alternativos (Erselius et al., 2000; Eraso & Ordoñez, 2005), incrementando notablemente la probabilidad de aumentar el rango de distribución hacia nuevas zonas.

Por el contrario, la influencia de las características ambientales sobre la distribución de los diferentes linajes clonales ha sido evidenciada en diferentes estudios. Las observaciones de Reis et al (2003) indican que los cultivos de papa crecen a bajas temperaturas a diferencia de otros cultivos como tomate que crecen en regiones con altas temperaturas, permitiendo suponer que estas poblaciones responden a las condiciones climáticas señalando una adaptación al ambiente.

Por el contrario, a diferencia del haplotipo IIa la distribución geográfica del haplotipo mitocondrial Ib (linaje clonal US-1) en *P. infestans* muestra que existen tres poblaciones con el mismo patrón de restricción RFLP en localidades geográficas separadas y hospedantes diferentes (*S. muricatum*, *S. lycopersicum* y *S. quitoense*, asumiendo en este ultimo la similitud de los perfiles para el primer P2 y P4 con el haplotipo mitocondrial Ib) (Ver Fig. 11 y 13; Anexo G). Este haplotipo refleja el modelo que hasta el momento se conoce para *P. infestans* en términos de distribución del patógeno donde no existe una

marcada subestructuración de las poblaciones como consecuencia de la ubicuidad de los hospedantes del patógeno: papa, tomate y pepino entre otras (Chacon, 2007), lo que evita que su distribución se restrinja a una sola localidad en particular. No obstante, estos resultados no permiten asegurar con certeza que todas las poblaciones con haplotipo mitocondrial Ib en hospedantes diferentes hayan surgido de una misma población inicial.

Para *P. andina* la distribución geográfica encontrada muestra claramente que esta especie se distribuye en las regiones templadas de Nariño y Putumayo donde se encuentran cultivos de *S. lycopersicum* y *S. betaceum* (Ver Fig. 11 y 12; Anexo G). Al parecer uno de los factores que limita la distribución de *P. andina* se relaciona con las características topográficas. Las observaciones realizadas en campo muestran que esta especie no puede establecerse eficientemente en cultivos de tomate de árbol sobre los 2500 msnm lo que señala cierta adaptación de este patógeno a las condiciones climáticas. Aunque para *P. andina* no existen estudios concretos que indiquen la influencia de las características ambientales sobre el patógeno, estudios realizados en Ecuador señalan que la influencia de los factores topográficos puede limitar el flujo génico en estas poblaciones siendo un factor clave la presencia de altitudes considerables con condiciones extremas de temperatura (Chacon, 2007).

Estudios realizados para *P. infestans* en este sentido indican ausencia de la enfermedad por encima de los 3500 msnm en solanáceas silvestres, (a pesar de la presencia de hospedantes que son infectados a menores altitudes) teniendo en cuenta que por encima de esta altura las bajas temperaturas evitan el desarrollo del fitopatógeno (Rivera-Peña., 1995). Igualmente, los estudios de Mizubuti *et al.*, (2000) indican que los esporangios del patógeno pueden ser susceptibles a la radiación solar, esto mismo se puede presentar para *P. andina*. Estudios realizados en Antioquia con aislamientos provenientes de diferentes pisos térmicos y diferentes hospedantes indican que los aislamientos procedentes de alturas más bajas (1450 msnm) tienden a ser más compatibles, afectando y reconociendo un mayor número de especies como posibles hospedantes que los aislamientos de las zonas más altas (Patiño *et al.*, 1997).

Otro de los factores que determina la subestructuración geográfica y distribución de *P. andina* ha sido relacionado con la elevada especificidad de hospedantes que le impide al patógeno migrar y sobrevivir en otros hospedantes, más aún cuando existen alturas considerables y un aislamiento por condiciones montañosas, al parecer existe adaptación a condiciones específicas de tiempo (Adler *et al.*, 2004; Chacon, 2007). A diferencia de estos reportes, en este estudio no se puede considerar que la especificidad de hospedante sea importante para determinar la distribución del linaje EC-3, el hecho de haber encontrado este genotipo en *S. lycopersicum* permite pensar que el patógeno es capaz de establecerse en otros hospedantes durante eventos de migración, lo que puede incrementar su rango de distribución hacia otras regiones.

Por último las poblaciones asociadas a *Phytophthora infestans sensu lato* en *S. betaceum* y *S. quitoense* al igual que algunas poblaciones de *P. infestans* presentan subgrupos con limitada distribución (Ver Fig. 12 y 13; Anexo G), Sin embargo, las pocas muestras obtenidas en el estudio no permiten sacar conclusiones reales de la distribución de estas poblaciones. Aun se requieren estudios detallados para dilucidar con claridad el comportamiento de estas poblaciones.

Los resultados obtenidos en el mapa indican claramente que más de un haplotipo mitocondrial se encuentra de forma simultánea sobre un mismo hospedante en ciertas regiones (Ver Fig. 14 y 15; Anexo G). Esto confirma las observaciones de diferentes estudios realizados para Colombia y Ecuador, donde algunos hospedantes son atacados por más de un grupo patogénico (Chacon, 2007). Este mecanismo sin duda ofrece una ventaja a las poblaciones del patógeno. La condición saprófita de las especies del complejo *Phytophthora* hace necesaria la asociación con un hospedante para garantizar su supervivencia (Lebreton *et al.*, 1999). Cuando una población presenta una adaptación especializada a un solo hospedante primario reduce notablemente su eficacia (Timms & Read, 1999) y pueden terminar sometidos a drásticos cuellos de botella cuando el hospedante primario está ausente (Drenth *et al.*, 1994; Lebreton *et al.*, 1999)

Por el contrario, si el patógeno tiene la posibilidad de encontrar hospedantes secundarios incrementa sus probabilidades de sobrevivir durante todo el año, reduciendo la pérdida demográfica en periodos negativos donde el hospedante principal ha sido cosechado o destruido por condiciones desfavorables de clima (Lebreton *et al.*, 1999; Chacon, 2007). Esta condición surge como resultado de las diferencias en las capacidades de supervivencia que le permiten al patógeno permanecer transitoriamente durante determinado ciclo de la enfermedad sin adaptarse completamente al hospedante (Forbes *et al.*, 1997; Oyarzun *et al.*, 1998; Erselius *et al.*, 1999; Ordoñez *et al.*, 2000).

Es importante tener en cuenta que este fenómeno solo es posible en regiones con una alta diversidad de hospedantes, como el caso del valle de Sibundoy donde las condiciones climáticas y ecosistémicas permiten el mantenimiento de una gran variedad de cultivos, lo que incrementa la posibilidad de transición entre hospedantes. Igualmente para Nariño, la transición entre hospedantes es evidente en las áreas donde más de un cultivo se encuentra presente.

Generalmente esta transición se da entre hospedantes emparentados genéticamente, (sección *Petota*, *Basarthrum*, *Lycopersicon*, *Juglandifolia*) en el caso de *P. infestans* y (sección *Lasiocarpa*, *Torva*, and *Pachyphylla*) para *P. andina*, donde muestran una mejor adaptabilidad (Bohs, 2005). Sin embargo, los resultados del estudio muestran que *P. andina* se encuentra atacando hospedantes de la sección *Lycopersicum* (más distantes genéticamente), esto implica que en algunas ocasiones el patógeno puede atacar hospedantes geográficamente disponibles aunque estos no estén emparentados con su hospedante primario, ocurriendo un “salto” del patógeno (Roy, 2001).

Este mecanismo bajo fuertes presiones de selección (producto del manejo de los agricultores) puede tener repercusiones evolutivas para el patógeno y epidemiológicas importantes en el tratamiento de la enfermedad: 1) es muy probable que se presente una adaptación paulatina del patógeno a nuevos hospedantes cuando se comparte un nicho ecológico siendo mucho más difíciles de controlar en el nuevo hospedante como ha ocurrido con el linaje clonal EC-1 (Jaramillo, 2003). 2) en el caso de poblaciones que presentan los dos de apareamiento se incrementa la probabilidad de flujo génico, lo que aumenta la probabilidad de recombinación sexual y variabilidad genética (Oliva *et al.*, 2002). Esto potencia la formación de híbridos con mayor ventaja evolutiva sobre sus parentales (Chacon, 2007) tal como se ha observado en otras especies de *Phytophthora* (Brasier *et al.*, 1999). Sin embargo, aunque no se puede descartar esta situación aun no se conocen casos concretos que indiquen hibridación interespecífica entre *P. andina* y *P.*

infestans. Aislamiento pre y post-cigótico en áreas de confluencia han sido suficientes para mantener restringida la recombinación sexual y el flujo génico entre estas especies (Ordoñez *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2002; Chacon, 2007). En estas circunstancias el manejo de la enfermedad es difícil de controlar y la probabilidad de epidemias se incrementa.

En forma inmediata estos resultados posibilitan el conocimiento de la estructura poblacional del patógeno y la identificación temprana de linajes clonales mediante marcadores genéticos moleculares. En este caso la identificación de especies diferentes a las conocidas hace necesario realizar estudios relacionados con la dinámica y el comportamiento de las nuevas especies en la región. A partir de esta información los agricultores y campesinos pueden efectuar controles de la enfermedad de acuerdo al posible linaje clonal que se establece teniendo en cuenta estudios previos relacionados con la patogenicidad en campo de cada linaje.

Igualmente bajo este contexto, este trabajo aporta al conocimiento de áreas críticas donde es necesario mantener un constante monitoreo del patógeno que permitan entender a fondo su comportamiento donde es evidente que aun las relaciones patogénicas no son claras.

CONCLUSIONES

El comportamiento de las poblaciones que atacan a *S. tuberosum* y *S. phureja* se mantiene constante en este hospedante. Se encontró predominancia del linaje clonal EC-1 a diferencia del linaje clonal US-1, dando indicios de un desplazamiento completo del linaje clonal US-1 por el linaje clonal EC-1. La presencia de la enfermedad fue más común en las variedades *Diacol capiro* y *roja*, lo que era de esperarse dada la ausencia de genes de resistencia a la enfermedad en estas variedades.

El primer reporte de la presencia de poblaciones de *Phytophthora andina* en *S. lycopersicum* indica que estas poblaciones no son específicas de *S. betaceum*, sino que pueden encontrarse en hospedantes diferentes aunque aun no se tenga evidencia suficiente para afirmar con exactitud si esta especie se encuentra o no adaptada a este hospedante en particular

Para tomate de árbol la presencia del linaje clonal EC-3 fue constante respecto a otros estudios. No obstante, la presencia de nuevos haplotipos puede indicar una subestimación de algunas poblaciones del patógeno para este hospedero, las cuales merecen especial atención en términos epidemiológicos.

En *S. quitoense* la presencia de *P. infestans* no es concreta, sin embargo la amplificación para dos secuencias de las tres típicas del patógeno nos dan la idea de que la presencia de esta población con características del haplotipo mitocondrial Ib, se puede considerar un evento aislado de la presencia del linaje clonal US-1; sin embargo este es el primer estudio realizado sobre este hospedante y requiere un seguimiento más detallado para confirmar la presencia del patógeno. La segunda población encontrada se clasificó dentro del grupo *Phytophthora infestans sensu lato*, los resultados de este estudio no dan conclusiones concretas sobre el status taxonómico de esta población.

La ausencia de cultivos pertenecientes a *S. muricatum* no permitió determinar claramente el comportamiento del patógeno en este hospedante. Es muy probable que un seguimiento de estas poblaciones reflejen en estudios posteriores la presencia del linaje clonal EC-2, tal como ha sido reportada en Ecuador.

La estructura poblacional del patógeno refleja la presencia de más de una especie atacando los cultivos de Solanáceas en el departamento de Nariño y Putumayo a diferencia de los que previamente se conocía. La presencia de nuevos haplotipos mitocondriales en las poblaciones estudiadas muestra que la variabilidad del complejo *Phytophthora* es mucho más alta que la que se había estimado para esta región.

La presencia de un complejo para el género *Phytophthora* en Nariño y Putumayo basado en el análisis de diferentes hospedantes muestra una dinámica del patógeno diferente del conocida hasta el momento, por lo que es necesario plantear nuevos mecanismos de control de la enfermedad, donde se tenga en cuenta la presencia de nuevas especies del

genero *Phytophthora*. Principalmente son de especial atención las zonas de confluencia de haplotipos, donde se necesita especial atención

PERSPECTIVAS

Los resultados de este trabajo dan una idea general de la organización del complejo *Phytophthora* en Nariño y Putumayo y ha servido como base para la formulación del macroproyecto “*Caracterización genética y fenotípica de las poblaciones de Phytophthora infestans procedentes de tomate de árbol (Cyphomandra betacea) en las zonas productoras del sur de Colombia*” financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) en convenio con la Universidad de Nariño, la asociación Agrícola y Frutícola de Santiago (Putumayo) y las alcaldías de Santiago y San Francisco con el fin de promover la investigación, el desarrollo tecnológico y propuestas de innovación en esta región.

Como continuación de esta investigación se plantea profundizar el conocimiento que se tiene acerca de la dinámica del patógeno y la relación planta-hospedante en zonas donde se han reportado nuevos genotipos. Conocer a fondo la probabilidad de flujo génico y reproducción sexual mediante pruebas de tipo de apareamiento. Estos resultados podrían igualmente dar indicios claros acerca de un posible proceso de recombinación entre especies presentes en un mismo hospedante que incrementaría la probabilidad de formación de híbridos. En este sentido se busca complementar con evaluaciones periódicas la agresividad de los aislados tanto por evaluación directa en campo a través del tiempo o por cuantificación de parámetros de agresividad *in leaf*.

El constante monitoreo del patógeno en áreas prioritarias de confluencia de los genotipos es necesario para entender la dinámica de la relación *Phytophthora/Solanácea* y poder establecer medidas de control adecuadas. La evaluación de especies silvestres como potenciales hospedantes de diferentes especies del genero *Phytophthora*, puede servir de base para complementar estos estudios. Sumado a esto, los resultados de la distribución de cada uno de los genotipos pueden servir de base para iniciar un seguimiento del patógeno en diferentes épocas del año con el fin de realizar un análisis temporal de las poblaciones y poder a futuro realizar una predicción eficiente de la ocurrencia de determinados genotipos.

BIBLIOGRAFIA

ABAD G., ABAD J. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of South America. En: Plant Disease. Vol. 81. No. 6 (1997); p. 682-688.

ADLER N., CHACON G., FLIER W and FORBES G. The Andean fruit crop, pear melon (*Solanum muricatum*) is a common host for A1 and A2 strains of *Phytophthora infestans* in Ecuador. En: Plant Pathology. Vol. 51, (2002); p: 802

ADLER N., CHACON G., FORBES G., FLIER W. *Phytophthora infestans* sensu lato in South America population substructuring through host-specificity. En: Lizarraga, C. (ed.). Late blight: Managing the global threat, proceedings. Lima (Peru). CIP. Global Initiative on Late Blight (GILB). 2002. ISBN 92-9060-215-5. pp. 13-17.

ADLER N., ERSELIUS L., CHACÓN M., FLIER W., ORDOÑEZ. M., KROON L., and FORBES G. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. En: Phytopathology. Vol. 94. no. 2, (2004); p.154-162

AGRIOS G. Fitopatología. 1ra edición. Editorial Limusa. Mexico. 2005

ANDERSON J and KOHN L. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. En: Annual Review of Phytopathology. Vol. 33, (1995.); p. 369-391.

AVILA ADAME C., GOMEZ-ALPIZAR L., ZISMANN V., JONES K., ROBIN C., RISTAINO J. Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. En: Curr Genet. Vol. 49 (2006); p. 39–46

BRASIER, C. Evolutionary biology of *Phytophthora*. En: Annual Rev. of Phytopathology. Vol: 30 (1992); p. 153-171

BURBANO O., APRAEZ N., GUERRA A y LAGOS L. Evaluación de la especificidad Hospedante-Patógeno de variedades comerciales de *S. tuberosum* a cepas provenientes de *Phytophthora infestans* provenientes de *S. tuberosum* y *S. betaceum*. Trabajo presentado en: XXVIII CONGRESO Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. ASCOLFI. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Palmira (2007)

CALDERON H y CASTRO M. Estructura poblacional del fitopatógenos *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Trabajo de grado para optar el título de Biólogos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. Instituto de Biología. Medellín. 2002

CARTER D., ARCHER S., BUCK K., SHAW D and SHATTOCK R. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. En: Mycol. Res. Vol. 94, (1990); p. 1123-1128

CASTAÑO J. Resúmenes. Manejo del tizón tardío de la papa: Estado actual. En: Papas Colombianas con el mejor entorno ambiental. Santa Fé de Bogotá. Comunicaciones y asociados. (1996); p 256

CEVIPAPA. Generalidades sobre el cultivo de la papa. <http://www.cevipapa.org.co/cultivo/generalidades.php> (2004)

CIP. Fomentando el crecimiento, la salud y la prosperidad. Centro Internacional de la Papa. En: Informe anual de la Papa. CIP. (2002). International Potato Center. Disponible en Internet, URL: <http://www.cipotato.org/publications/annual_reports/2002spa/06_lateblight.asp>

CHACON G. Variability of *Phytophthora infestans sensu lato* in the highland tropics of Ecuador. Doctoral Thesis. 2007

COFFEY M and GEES R. The cytology of development. En: INGRAM D y WILLIAMS P (eds). Advances in Plant pathology. *Phytophthora infestans*, the cause of late Blight of Potato. Academic press. Volumen 7. London (1991)

DEACON J. Introducción a la Micología moderna. México. Editorial Limusa. (1990) p. 234

DEAHL K., GOTH R., YOUNG R., SINDEN S and GALLEGLY M. Occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in potato field in the United States and Canada. En: American Potato Journal. Vol. 68, (1991); p. 717-725

DOWLEY, O'SULLIVAN E, GRIFFIN D, HARMEY M. Genetic analysis of Irish populations of *Phytophthora infestans*. Agriculture and food development authority, 2000. Disponible en Internet, URL: <http://www.teagasc.ie/research/reports/crops/4148/eopr-4148.htm>

DRENTH A., GOODWIN S., FRY W and DAVIDSE L. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphism. En: Phytopathology. Vol. 83, (1993); p. 1087-1092

DRENTH A., JANSSEN E., and GOVERS F. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions. En: Plant pathology. Vol 44 (1995); p. 86-94

ERASO D, ORTIZ J. Caracterización genotípica de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (*Mont*) de *Bary* aisladas de tomate de árbol (*Solanum tuberosum*) y tomate de mesa (*Lycopersicon sculentum*) en los departamentos de Nariño y Putumayo. Trabajo de grado para optar el título de Biólogo con énfasis en microbiología. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Universidad de Nariño. Programa de Biología San Juan de Pasto. 2005

ERSELIUS L., HOHL H., ORDOÑEZ M., JARRÍN F., VELASCO A., RAMON M. Y FORBES G. Genetic diversity among isolates of *Phytophthora infestans* from various

hosts in Ecuador. pp. 39--48 in: Impact on a Changing World. Program Report 1997--1998. International Potato Center, Lima, Peru. (1999)

ERSELIUS L., VEGA-SANCHEZ M., AND FORBES G. Stability in populations of *Phytophthora infestans* attacking tomato in Ecuador demonstrated by cellulose acetate assessment of glucose-6-phosphate isomerase. En: Plant disease. Vol. 84 (2000); p. 325-327

ERSELIUS L., & FORBES G. *Phytophthora infestans* in the Andes: Unraveling the Mysteries. En: Global Initiative on Late Blight (GILB). 2005. Disponible en Internet: <http://gilb.cip.cgiar.org/uploads/media/31erseli.pdf>

ERWIN D and RIBEIRO O. *Phytophthora* Diseases worldwide. APS. Minesota: Press the American Phythopatological society. St Paul, 1996 p. 562

FORBES G., GOODWIN, S., DRENTH A., OYARZUM P., ORDONEZ M and FRY W. A global marker database for *Phytophthora infestans*. En: Plant Disease. Vol. 82, (1998); p. 811-818.

FORBES G., ESCOBAR C., AYALA C., REVELO J., ORDOÑEZ M., FRY B., DOUCETT K., and FRY W. E. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador. En: Phytopathology. Vol. 87, no. 4 (1997); p. 375-380

FRY W and GOODWIN S. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. En: Plant Dis. Vol. 81, (1997); p. 1349-1357.

FRY W. "On - line Laboratory manual for *P infestans* work at CIP- Quito" (1997) Disponible en Internet, <URL: http://documents.plant.wur.nl/pri/Biointeractions/Lab%20protocols_PLB/CIPmanual97.pdf>

FRY W., GOODWIN S., MATUSZZK J., SPIELMAN L., MILGROOM M and DRENTH A. Populations genetics and intercontinental migration of *Phytophthora infestans*. En: Ann. Rev. Phytopathology. Vol. 30, (1992); p. 107-129

FRY W, GOODWIN S, DUER A, MTUZSAK J, DREHTE A, TOOLEY P, SUJKOWSKY L, KOOH Y, COHEN B, SPIELMAN L, INGLIS D, SANDLAN K. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways and implications. Plant disease, 1993. 77 (7): 653-661

GARRY G., FORBES G., SALAS A., PEREZ W., SANTA CRUZ M., PINEDO H., GONZALES E., RIVERA M and NELSON R. Characterization of *Phytophthora infestans* colonizing different Solanaceous species in Peru, with implications on the control of potato late blight. International Potato Center (CIP), Lima (Peru). Scientist and farmer: Partners in research for the 21st century. Lima (Peru). CIP. 2001. pp. 39-47. ISSN 1680-9270. AP(AR.2018)

GAVINO P and FRY W. Diversity in and evidence for selection mitochondrial genome of *Phytophthora infestans*. En: *Mycologia*. Vol. 94, no. 5 (1998); p. 781 - 793

GBIF-Global Biodiversity Information Facility. Disponible en Internet, <URL:http://www.europe.gbif.net/portal/ecat_browser.jsp?taxonKey=496143&countryKey=0&resourceKey=0> (Consultado 5 de Abril de 2007)

GILB. 2006. Global Initiative on Late Blight. <http://gilb.cip.cgiar.org/index.php>

GILCHRIST E. Evaluación de la diversidad genética y patogénica de las poblaciones del hongo *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en Antioquia. Trabajo de grado para optar el título de Magíster Science en Biotecnología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Programa de Biología. Medellín. 2001

GISI U and COHEN Y. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. En: Annu. Rev. Phytopathol. Vol.34, (1996); p. 549-572.

GÓMEZ-ALPIZAR L., CARBONE I, & RISTAINO J. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. En: PNAS. Vol. 104 no. 9 (2007); p. 3306–3311

GOODWIN S and DRENTH A. Origin of the A2 Mating Type of *Phytophthora infestans* Outside Mexico. En: Phytopathology. Vol. 87, no. 10 (1997); p. 992-999

GOODWIN S. The population's genetics of *Phytophthora*. En: Phytopathology. Vol. 87, (1997); p. 462-463

GOODWIN S., COHEN B., AND FRY W. Panglobal distribution of a single clonal lineage of Irish potato famine. En: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 91, (1994); p.1591-1595.

GOODWIN S., SPIELMAN L., MATUSZAK J., BEGERON S and FRY W. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in Northern and Central Mexico. En: Phytopathology. Vol. 82, (1992); p. 955-961

GOODWIN S., SUJKUWSKI L., AND FRY W. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. En: Phytopathology. Vol. 85, (1995); p. 669-676

GRIFFITH G and SHAW D. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*. Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or from Host Lesions. En: Applied and Environmental microbiology. Vol. 64, no. 10 (1998); p. 4007–4014

HIRST J., AND STEDMAN O. The epidemiology of *Phytophthora infestans*. II. The source of inoculum. En: Ann. Appl. Biol. Vol. 48 (1960); p. 489-517

JARAMILLO S. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad nacional de Colombia Sede Medellín. 2003

JUDELSON H. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. En: Molecular Gen Genetic. Vol. 252, (1996); p. 155-161

JUDELSON H. Recent advances in the genetics of Oomycete plant pathogen. En: Mol Plant-Microbe. Vol 9, (1996); p. 443-449

KAMOUN S, HRABER P, SOBRAL B, NUSS D, GOVERS F. Initial assessment of gene diversity for the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences. En: Fungal Genetics and Biology. Vol. 28, (1999); p. 94-106

KAMOUN S. Molecular genetics of pathogenic oomycetes. En: Eukaryot Cell. Vol. 2, (2003); p.191–199

KO W. An alternative possible origin of A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. En: Phytopathology. Vol. 84, (1994); p. 1224-1227

KOH Y., GOODWIN S., DYER A., COHEN B., OGOSHI A., SATO N and FRY W. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries. En: Phytopathology. Vo. 84, (1994); p. 1224-1227

KROON L., BAKKER F., VAN DEN BOSCH G., BONANTS P, & FLIER W. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. En: Fungal Genetics and Biology. Vol. 41 (2004); p. 766–782

LAGOS L. Aislamiento y caracterización genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (mont.) de Bary en las zonas productoras de papa (*Solanum tuberosum*) en el departamento de Nariño. Trabajo de grado para optar el título de Magíster en Ciencias. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Universidad del Valle. Santiago de Cali. 2002

LEBRETON, L., LUCAS J., ANDRIVON D: Aggressiveness and Competitive Fitness of *Phytophthora infestans* isolates collected from Potato and Tomato in France. En: Phytopathology. Vol. 89 (1999); p. 679-686

LEE S., WHITE T and TAYLOR J. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. En: Phytopathology. Vol. 83, (1993); p. 177-181

LEÓN H. Evaluación de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary colectados en Antioquia mediante Tipo de Apareamiento y Haplotipos Mitocondriales. Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Medellín. 2004

LOSOYA-SALDAÑA H., PERALES-ROSAS D., FERNANDEZ-PAVIA S., GRÜNWARD N. Characterization of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Subpopulations obtained from wild *Solanum* species. En: Agrociencia. Vol 40, no. 3 (2006); p. 325-335.

MARIN, M. Y MIRA, J.J. Caracterización de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislamiento de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, en diferentes piso térmicos y hospedantes en el Departamento de Antioquia. Medellín, 1998, p. 56. Tesis Pregrado. Universidad Nacional de Colombia.

MILLER J., & JOHNSON D. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions. En: Phytopathology. Vol. 90 (2000); p. 220-27.

MIZUBUTI E., and FRY W. Temperature effects on developmental stages of isolates from three clonal lineages of *Phytophthora infestans*. En: Phytopathology. Vol. 88 (1998); p. 837-843.

MIZUBUTI E., AYLOR D., and FRY W. Survival of *Phytophthora infestans* sporangia exposed to solar radiation. En: Phytopathology. Vol. 90 (2000); p. 78-84.

NIEPOLD and SCHÖBER-BUTIN. Application of the PCR technique to detect *Phytophthora infestans* in potato tubers and leaves. En: Microbial Res. Vol. 15 (1995); p. 379-385

OCHOA Colombia. Oficina para la coordinación de Asuntos Humanitarios. Naciones Unidas Colombia. Centro de mapas. Disponible en la pagina <http://www.colombiassh.org/site/>

OLIVA R., ERSELIUS L., ADLER N., FORBES G. Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador. En: Plant Pathology. Vol. 51 (2002); p. 710-19.

OLIVA R., CHACON G., GALARZA M., OCHOA J., FLIER W., GESSLER C AND FROBES G. Genetic structure of *Phytophthora infestans sensu lato* attacking *Solanum quitoense* in Ecuador. International Potato Center (CIP), 2005

OLIVA R., FLIER W., KROON L., RISTAINO J., & FORBES G. *Phytophthora andina* a newly identified heterothallic pathogen of Solanaceous hosts in the Andean highlands. *En impresión*.

OPCION PUTUMAYO. Valle de Sibundoy. (2007). Disponible en Internet, <URL:<http://personales.com/colombia/cal/ONGFOP/valle.htm>>

ORDOÑEZ M., HOHL H., VELASCO J., RAMON M P., OYARZUN P., SMART C., FRY W., FORBES G., and ERSELIUS L. A novel population of *Phytophthora*, similar to *P. infestans* attacks wild *Solanum* species in Ecuador. En: Phytopathology. Vol. 90 (2000); p. 197 – 202.

OYARZUN, P. J., ORDOÑEZ, M. E., AND FORBES, G. A. 1997. First report of *Phytophthora infestans* A2 mating type in Ecuador. En: Plant Dis. Vol. 81, (1997); p. 311.

OYARZUN P., POZO A., ORDONEZ M., DOUCETT K., AND FORBES G. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. En: Phytopathology. Vol. 88, (1998); p. 265-271.

PAEZ O., VALVERDE R., GOMEZ L y BRENES A. Determinación del tipo de apareamiento con marcadores moleculares en aislamientos de *Phytophthora infestans*

colectados en plantaciones de papa en Costa Rica. En: *Agronomía Costarricense*. Vol. 28. No. 2 (2004); p. 9 -16.

PAEZ O., VALVERDE R., GOMEZ L y BRENES A. Diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en plantaciones de papa en Costa Rica con el uso de RAPD. En: *Agronomía Costarricense*. Vol. 29, no. 1 (2005); p. 45-55.

PATIÑO L., MORALES J., BURITICA P., ZAPATA J y JARAMILLO S. Comportamiento ecológico y poblacional de la interacción de *Phytophthora infestans* con diferentes Solanáceas. En: *Fitopatología Colombiana*. Vol. 22, No. 2 (1997); p. 54.

PEREZ, *et al.* Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. En: *Phytopathology*. Vol. 91, no 10 (2001); p. 956-965

PLATT H., PETERS R, MEDINA M., AND ARSENAULT W. Impact of seed potatoes infected with *Phytophthora infestans* (US-1 or US-8 genotypes) on crop growth and disease. En: *risk. Am. J. Pot. Res.* Vol. 75 (1999); p.67-73.

RAIGOSA N y AMAYA M. Análisis de la variabilidad genética de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* utilizando marcadores moleculares. Trabajo de grado para optar el título de Ingeniera Agrónoma. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Departamento de Ciencias Agronómicas. Medellín. 2006

REIS A., SMART C., FRY W., MAFFIA L., AND MIZUBUTI E. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from southern and southeastern Brazil from 1998 to 2000. En: *Plant Dis.* Vol. 87 (2003); p.896-900.

REVELO E., DORADO G., BURBANO O., y LAGOS L. Evaluación del grado de susceptibilidad de dos variedades de *Solanum betaceum* provenientes del valle de Sibundoy a *Phytophthora infestans*. Trabajo presentado en: XXVIII CONGRESO Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. ASCOLFI. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Palmira (2007)

RISTAINO J. The importance of archival and herbarium materials in understanding the role of oospores in late blight epidemics of the past. En: *Phytopathology*. Vol. 88, (1998); p.1120–1130

RIVERA-PEÑA A. Racial composition in a population of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Toluca Valley and slopes of the volcano Nevado de Toluca over the period 1989-1994. En: DOWLEY L., BANNON E., COOKE L., KEANE T., O'SULLIVAN E (eds). *Phytophthora infestans 150*. European Association for Potato Research (EAPR). Pathology Section Conference, held in Trinity College, Ireland. Boole Press in conjunction with Teagasc for EAPR. (1995).

ROHNER A. Genetic characterisation of early-seasonal isolates of *Phytophthora infestans* from Switzerland. 2002 Diploma thesis

ROY B. Patterns of association between crucifers and the flower-mimic pathogens: host jumps are more common than coevolution or cospeciation. En: *Evolution*. Vol. 55 (2001); p. 41-53. Citado por: CHACON G. Variability of *Phytophthora infestans sensu lato* in the highland tropics of Ecuador. Doctoral Thesis. 2007

SAMAUCHA Y and GISI U. Use of two- and three-way mixtures to prevent development of resistance to phenylamide fungicides in *Phytophthora* and *Plasmopora*. En: *Phytopathology*. Vol. 77, (1987); p.1405-1409.

SHAW D., FYFE A., HIBBERD P and ABDEL-SATTAR M. Occurrence of the rare A2 mating type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual progeny with A1 mating type from the UK. En: *Plant Pathol.* Vol. 34, (1985); p. 552-556

SPEILMAN A., DRENTH A., DAVIDSE L., SUJKOWSKI L., GO W., TOOLEY P., AND FRY W. Second worldwide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. En: *Plant Pathology*. Vol. 40, (1991); p. 422-430.

SUJKOWSKI L., GOODWIN S., DYER A., y FRY W. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. En: *Phytopathology*. Vol. 84 (1994); p. 201-207.

TAXONOMY BROWSER. NCBI- National Center of Biotechnology Information. Disponible en Internet, <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=403677&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>> (Consultado 5 de Abril de 2007)

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. Disponible en <http://www.ipni.org/> (Consultado Agosto de 2008)

TIMMS R., and READ A. What makes a specialist special?. En: *Trends Ecol. Evol.* Vol. 14 (1999); p. 333-34.

TOOLEY P., BUNYARD B., CARRAS M., AND HATZILOUKAS E. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. En: *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 63 (1997); p.1467-1475.

TROUT C., RISTAINO J., MADRITCH M., AND WANGSOMBOONDEE T. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight-infected potato and tomato using PCR. En: *Plant Dis.* Vol. 81 (1997); p.1042- 1048.

VAN der LEE, T., WITTE De I.J.,DRENTH A., ALFONSO C. and GOVERS. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans*. En: *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 21(1997); 278–291.

WANGSOMBOONDEE T Y RISTAINO J. Optimization of sample size and DNA extraction methods to improve PCR detection of different propagules of *Phytophthora infestans*. En: *Plant Dis.* Vol. 86, (2002); p. 247-253

ANEXOS

Anexo A. Registro de localidades y cultivos incluidos en el estudio.

Código	Hospedero sp	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Fecha	Propietario del cultivo	a.s.n.m (m)
1	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Genoy	Sin registro	Sin registro	Sin registro	2482
100	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	Genoy	Sin registro	Sin registro	Sin registro	2482
127	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	Cabrera	La paz	Sin registro	Sin registro	2797
128	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Cabrera	Centro	Sin registro	Sin registro	2797
152	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Catambuco	Sin registro	Sin registro	Sin registro	2848
154	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	Catambuco	Sin registro	Sin registro	Sin registro	2848
701	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Santiago	Las Cruces	Sin registro	Ruperto revelo	0
702	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Putumayo	Santiago	Las Cruces	Sin registro	Ruperto revelo	0
703	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Gualmatan	Quatis	Sin registro	Sin registro	0
704	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Santiago	El cascajo	Sin registro	Sin registro	0
720	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	La Laguna	Sin registro	05-ago-07	María Otilia Josa Pardo	2798
721	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	La Laguna	Sin registro	05-ago-07	Ventura quendal	2798
722	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	La Laguna	Sin registro	05-ago-07	Nixeh Mugro	2798
723	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	La Laguna	Sin registro	05-ago-07	Jose Rafael Botina	2789
724	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	La Laguna	El barbero	05-ago-07	Isaura Josa	2789
725	<i>Physalis spp.</i>	Sin registro	Nariño	La Laguna	El barbero	05-ago-07	Luis Humberto	2810
726	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	La Laguna	El barbero	05-ago-07	Luis Humberto	2810
729	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	La Laguna	El barbero	05-ago-07	Luis Gonzalo Jojoa	2782
730	<i>Capsicum spp.</i>	Sin registro	Nariño	Obonuco	San Jose	10-sep-07	Velas Margarita	2781
731	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	Obonuco	San Sebastián	10-sep-07	María Dolores Villota	2783
732	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	Obonuco	San Sebastián	10-sep-07	Casa 199B	2783
733	<i>S. betaceum</i>	Roja	Nariño	Obonuco	San Sebastián	10-sep-07	Casa 199B	2783

Código	Hospedero sp	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Fecha	Propietario del cultivo	a.s.n.m
734	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	Catambuco	Sagrada Familia	14-sep-07	Sin registro	2830
735	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Catambuco	Sagrada Familia	14-sep-07	Jairo Mirama	2830
736	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	Catambuco	Sagrada Familia	14-sep-07	Sin registro	2830
737	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Catambuco	Sagrada Familia	14-sep-07	Julia Emperatriz Burbano	2830
738	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Catambuco	Sin registro	14-sep-07	Sin registro	2848
740	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	Catambuco	Polideportivo	14-sep-07	Sin registro	2848
741	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Catambuco	Santa teresita alto	14-sep-07	Myriam Gomajoa	2849
742	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	Catambuco	Santa teresita alto	14-sep-07	Maria Delgado	2849
743	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	Catambuco	San Juan diego	14-sep-07	Franco Enrique timana	2841
744	<i>S. betaceum</i>	Roja	Nariño	Catambuco	San Juan diego	14-sep-07	Franco Enrique timana	2841
745	<i>Capsicum spp.</i>	Sin registro	Nariño	Catambuco	San Juan diego	14-sep-07	Sin registro	2841
746	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Catambuco	Sin registro	14-sep-07	Sin registro	2841
747	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Emperatriz Lopez	2778
748	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Emperatriz Lopez	2778
749	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Emperatriz Lopez	2778
752	<i>S. betaceum</i>	Roja	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Robertina Lopez	2775
753	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Robertina Lopez	2788
755	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Robertina Lopez	2788
756	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Robertina Lopez	2788
757	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Robertina Lopez	2788
758	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Humberto Lopez	2787
759	<i>S. betaceum</i>	Roja	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	21-sep-07	Humberto Lopez	2787
761	<i>S. betaceum</i>	Roja	Nariño	Encano	Vía al puerto	15-oct-07	Leonila Piscal	2823
762	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	Encano	Vía al puerto	15-oct-07	Leonila Piscal	2823

Código	Hospedero spp.	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Fecha	Propietario del cultivo	a.s.n.m
764	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	Encano	Vía al puerto	15-oct-07	Jose Tovias Narvaez	2823
765	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Encano	Vía al puerto	15-oct-07	Jose Tovias Narvaez	2823
766	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Encano	Vía al puerto	15-oct-07	Francisco Diaz	2823
768	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Nariño	Encano	Vía al puerto	15-oct-07	Francisco Diaz	2823
770	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Encano	Sin registro	15-oct-07	Jose Maria Jojoa	2978
771	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	Encano	Sin registro	15-oct-07	Jose Maria Jojoa	2978
772	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Pasto	Vereda chavez	17-oct-07	Sin registro	2725
773	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Pasto	Vereda chavez	17-oct-07	Servio timana	2725
774	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Pasto	Vereda chavez	17-oct-07	Servio timana	2696
775	<i>S. tuberosum</i>	Parda mejorada	Nariño	Cumbal	Tilizmal	19-oct-07	Felipe Escobar	3160
776	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	Cumbal	Tilizmal	19-oct-07	Felipe Escobar	3160
777	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Cumbal	Tilizmal	19-oct-07	Felipe Escobar	3160
778	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Guachuca-Aldan	Sin registro	19-oct-07	Sin registro	3241
779	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Guachuca-Aldan	Sin registro	19-oct-07	Sin registro	3241
780	<i>S. tuberosum</i>	Parda Basica	Nariño	Guachuca-Aldan	Sin registro	19-oct-07	Segundo Ceballos	3269
781	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Guachuca-Aldan	Sin registro	19-oct-07	Ramiro Tutalcha	3280
783	<i>S. tuberosum</i>	ICA Morasurco	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Vicente Mera	3238
784	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Jose Arteaga	3238
785	<i>S. tuberosum</i>	Parda Básica	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Susana Ceron	3236
786	<i>S. tuberosum</i>	Parda Básica	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Luis Felipe Mera	3233
787	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Luis Felipe Mera	3233
788	<i>S. tuberosum</i>	ICA Morasurco	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Luis Felipe Mera	3233
789	<i>S. tuberosum</i>	Parda Básica	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Alberto Nazner	3237
790	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Marta Mora	3237

Código	Hospedero spp.	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Fecha	Propietario del cultivo	a.s.n.m
792	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Eduardo Alirio Mera	3273
793	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Oligario Marinez	3279
794	<i>S. tuberosum</i>	Parda mejorada	Nariño	Tuquerres	Olaya	20-oct-07	Oligario Marinez	3279
795	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Medardo Hernandez	3192
797	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Luis Alberto Ruano	3174
798	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Luis Alberto Ruano	3174
799	<i>S. tuberosum</i>	Parda mejorada	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Luis Alberto Ruano	3174
7100	<i>S. tuberosum</i>	Unica	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Luis Alberto Ruano	3174
7101	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Miguel oliva	3174
7102	<i>S. tuberosum</i>	Parda Basica	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Sin registro	3174
7103	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Sin registro	3174
7104	<i>S. tuberosum</i>	Parda Basica	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Elias Calderon	3174
7105	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Wilson Ascuntar	3174
7106	<i>S. tuberosum</i>	Parda Basica	Nariño	Tuquerres	Espino	20-oct-07	Sin registro	3174
7110	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	Ipiales	Las Aldeas	31-oct-07	Segundo Aite	2864
7111	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	Ipiales	Las Aldeas	31-oct-07	Segundo Aite	2864
7112	<i>S. tuberosum</i>	Unica	Nariño	Ipiales	Las Aldeas	31-oct-07	Segundo Aite	2864
7113	<i>S. tuberosum</i>	Unica	Nariño	Ipiales	Las Aldeas	31-oct-07	Luis Irua	2864
7117	<i>S. betaceum</i>	Roja	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	16-nov-07	Fabian Burgos	2764
7118	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	16-nov-07	Fabian Burgos	2764
7119	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	16-nov-07	Fabian Burgos	2764
7120	<i>S. sibundoyensis</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	16-nov-07	Fabian Burgos	2764
7123	<i>Capsicum sp</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	16-nov-07	Fabian Burgos	2764
7124	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	16-nov-07	Gloria Teresita Paz	2739

Código	Hospedero spp.	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Fecha	Propietario del cultivo	a.s.n.m
7126	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	16-nov-07	Gloria Teresita Paz	2739
7127	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	Jaime Timana	0
7128	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	Oscar Chazui	0
7130	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	Oscar Chazui	0
7131	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	Sin registro	0
7132	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	pablo Emilio Chazui	0
7134	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	Victor Emilio chazui	0
7135	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	Sin registro	0
7137	<i>S. betaceum</i>	Roja	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	Sin registro	0
7138	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Putumayo	Colon	Las Palmas	16-nov-07	Gloria Teresita Paz	0
7139	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Putumayo	Santiago	Las cruces	16-nov-07	Ruperto revelo	2323
7140	<i>S. betaceum</i>	Roja	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	02-dic-07	Sin registro	0
7142	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	02-dic-07	Sin registro	0
7143	<i>S. betaceum</i>	Holandeza	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	02-dic-07	Silvio Quitiaquez	0
7144	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	02-dic-07	Jairo Quitiaquez	0
7147	<i>S. quitoense</i>	Quitoense	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	02-dic-07	Ignacio Burbano	0
7149	<i>S. quitoense</i>	Quitoense	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	02-dic-07	Gerardo Ceballos	0
7151	<i>S. quitoense</i>	Quitoense	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	02-dic-07	Ignacio Burbano	0
7152	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	Versalles	02-dic-07	Gloria España	2113
7154	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	Versalles	02-dic-07	Gloria España	2113
7155	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	Versalles	02-dic-07	Leonisa Duarte	2113
7156	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Sibundoy	Nueva Esperanza	02-dic-07	Edilma España	2113
7157	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	Iles	Capuli	03-dic-07	Marco Tulio Canchala	1990
7158	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	Iles	Capuli	03-dic-07	Aurelio Jimenez	1990

Código	Hospedero sp	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Fecha	Propietario del cultivo	a.s.n.m
7160	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	Iles	Capuli	03-dic-07	Marco Tulio Canchala	1990
7161	<i>S. betaceum</i>	Roja	Nariño	Iles	Capuli	03-dic-07	Marco Tulio Canchala	1990
7163	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	Imues	Pilcuan	03-dic-07	Luis Antonio Lopez	1751
7164	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	Imues	Pilcuan	03-dic-07	Luis Antonio Lopez	1751
7165	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	Buesaco	Sumapaz	08-dic-07	Clemente Burbano	1713
7166	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	Buesaco	Naranjal	08-dic-07	Julio Olaya	1711
7168	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	Buesaco	Higueron	08-dic-07	Robert Jurado	1711
7170	<i>S. quitoense</i>	Quitoense	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Arvey Diaz	2147
7171	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Arvey Diaz	2147
7172	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Arvey Diaz	2147
7177	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Sin registro	2147
7180	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Claudio Gomez	2147
7183	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Leonel Ahumada	2092
7184	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Leonel Ahumada	2092
7185	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Leonel Ahumada	2092
7188	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Rafael Erazo	2092
7189	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Rafael Erazo	2092
7190	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Custodia Fernandez	2092
7191	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	La Unión	Cartago	12-dic-07	Diego Ahumada	2092
7192	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Yolanda Jojoa	2840
7193	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Yolanda Jojoa	2840
7194	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Octavio Jesús Josa	2840
7195	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Octavio Jesús Josa	2840
7196	<i>S. tuberosum</i>	Cariza	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Octavio Jesús Josa	2840

Código	Hospedero spp.	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Fecha	Propietario del cultivo	a.s.n.m
7197	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Arturo Josa	2839
7198	<i>S. tuberosum</i>	Parda Basica	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Sixto Guerrero	2849
7199	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Sixto Guerrero	2838
7200	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	20-dic-07	Sixto Guerrero	2849
7201	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	20-dic-07	Jaime Caicedo	2790
7202	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	20-dic-07	Humberto Lopez	2787
7203	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	20-dic-07	Humberto Lopez	2787
7204	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	20-dic-07	Humberto Lopez	2787
7205	<i>S. muricatum</i>	Variedad 1	Putumayo	Sibundoy	Bellavista	24-ene-08	Rafael	0
7206	<i>S. muricatum</i>	Variedad 2	Putumayo	Sibundoy	Bellavista	24-ene-08	Rafael	0
7207	<i>S. tuberosum</i>	Parda Andina	Putumayo	Sibundoy	Bellavista	24-ene-08	Rafael	0
7208	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Putumayo	Sibundoy	Bellavista	24-ene-08	Rafael	0
7210	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Sibundoy	Bellavista	24-ene-08	Rafael	0
7211	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Putumayo	San Francisco	SENA	24-ene-08	SENA	0

* Fecha en que se realizó la colecta del material.

Anexo B. Variedades registradas para cada hospedante en Nariño y Putumayo.

Hospedante	Variedad	Nº de cultivos registrados	
		Nariño	Putumayo
<i>S. tuberosum</i>	Diacol capiro	16	-
	Roja	14	-
	Parda pastusa	8	-
	Unica	3	-
	Parda mejorada	3	-
	ICA morasurco	2	-
	Parda Andina	-	1
	Carrizo	1	-
	Sin registro	19	2
<i>S. phureja</i>	Sin registro	8	
<i>S. betaceum</i>	Amarilla	10	9
	Roja	6	3
	Holandesa	-	1
	Sin registro	9	8
<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	10	1
<i>S. quitoense</i>	Quitoense	1	3
	Septentrional	6	5
<i>S. muricatum</i>	Variedad 1	-	1
	Variedad 2	-	1
<i>Capsicum spp</i>	Sin registro	2	1
<i>S. sibundoyensis</i>	Sin registro	-	1
<i>Physallis spp.</i>	Sin registro	1	-

Anexo C. Muestras positivas para la presencia de *Phytophthora* con su respectivo Haplotipo mitocondrial y posible linaje clonal

Código	Hospedero sp	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Propietario del cultivo	a.s.n.m	HM	Genotipo
7127	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Colon	Las Palmas	Jaime Timana	0	la	EC-3
7128	<i>S. betaceum</i>	Hospedero	Putumayo	Colon	Corregimiento o	Oscar Chazui	0	la	EC-3
Código	Hospedero sp	var	Depart.	Localidad	Vereda	Propietario del cultivo	(m)	HM	Genotipo
7130	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Colon	Las Palmas	Oscar Chazui	0	Hsb-I	SD
100	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Narino	Genoy	Sin registro	Sin registro	2482	la	EC-3
7131	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Colon	Las Palmas	Sin registro	0	la	EC-3
127	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Narino	Cabrera	La paz	Sin registro	2797	Hsb-I	SD
7134	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Colon	Las Palmas	Victor Emilio chazui	0	la	EC-3
128	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Narino	Cabrera	Centro	Sin registro	2797	lla	EC-1
7135	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Colon	Las Palmas	Sin registro	0	la	EC-3
152	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Narino	Catambuco	Sin registro	Sin registro	2848	lla	EC-1
7137	<i>S. betaceum</i>	Roja	Putumayo	Colon	Las Palmas	Sin registro	0	la	EC-3
154	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Narino	Catambuco	Sin registro	Sin registro	2848	Hsb-I	SD
7140	<i>S. betaceum</i>	Roja	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	Sin registro	0	la	EC-3
701	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Santiago	Las Cruces	Ruperto revelo	0	la	EC-3
7143	<i>S. betaceum</i>	Holandeza	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	Silvio Quitiaquez	0	la	EC-3
702	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Putumayo	Santiago	Las Cruces	Ruperto revelo	0	lla	EC-1
7147	<i>S. quitoense</i>	Quitoense	Putumayo	Sibundoy	San Pedro	Ignacio Burbano	0	Hsq-II	SD
729	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Narino	La Laguna	El barbero	Luis Gonzalo Jojoa	2762	lla	EC-1
7152	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	Versalles	Gloria Espana	2113	la	EC-3
764	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Narino	Encano	Via al puerto	Jose Tovas Narvaez	2823	lla	EC-1
7154	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	Versalles	Gloria Espana	2113	lla	EC-1
766	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Narino	Encano	Via al puerto	Francisco Diaz	2823	lla	EC-1
7155	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Putumayo	Sibundoy	Versalles	Leonisa Duarte	2113	la	EC-3
770	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Narino	Encano	Sin registro	Jose Maria Jojoa	2978	lla	EC-1
7156	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Sibundoy	Nueva Esperanza	Edilma Espana	2113	la	EC-3
771	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Narino	Encano	Sin registro	Jose Maria Jojoa	2978	lla	EC-1
7161	<i>S. betaceum</i>	Hoja	Narino	Iles	Capuli	Marco Tulio Canchala	1990	la	EC-3
795	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Narino	Tuquerres	Espino	Medardo Hernandez	3192	lla	EC-1
7163	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Narino	Imues	Pilcuan	Luis Antonio Lopez	1751	la	SD
7101	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Narino	Tuquerres	Espino	Miguel oiiva	3174	lla	EC-1
7164	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Narino	Imues	Pilcuan	Luis Antonio Lopez	1751	lp	US-1
7102	<i>S. tuberosum</i>	Parda Basica	Narino	Tuquerres	Espino	Sin registro	3174	lla	EC-1
7165	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Narino	Buesaco	Sumapaz	Clemente Burbano	1713	lp	US-1
7103	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Narino	Tuquerres	Espino	Sin registro	3174	lla	EC-1
7184	<i>S. quitoense</i>	septentrional	Narino	La Union	Cartago	Leonel Ahumada	2092	Hsq-I	SD
7110	<i>S. tuberosum</i>	Sin registro	Narino	Ipiates	Las Aideas	Segundo Aite	2864	lla	EC-1
7188	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Narino	La Union	Cartago	Rafael Erazo	2092	la	SD
7111	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Narino	Ipiates	Las Aideas	Segundo Aite	2864	lla	EC-1
7189	<i>S. lycopersicum</i>	Sin registro	Narino	La Union	Cartago	Rafael Erazo	2092	la	SD
7112	<i>S. tuberosum</i>	Unica	Narino	Ipiates	Las Aideas	Segundo Aite	2864	lla	EC-1
7190	<i>S. betaceum</i>	Sin registro	Narino	La Union	Cartago	Custodia Fernandez	2092	la	EC-3
7113	<i>S. tuberosum</i>	Unica	Narino	Ipiates	Las Aideas	Luis Irua	2864	lla	EC-1
7194	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Narino	La Laguna	Aito San Pedro	Octavio Jesus Josa	2840	lla	EC-1
7117	<i>S. betaceum</i>	Roja	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	Fabian Burgos	2764	la	EC-3
7199	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Narino	La Laguna	Aito San Pedro	Sixto Guerrero	2838	lla	EC-1
7118	<i>S. betaceum</i>	Amarilla	Putumayo	Sibundoy	La Hidraulica	Fabian Burgos	2764	la	EC-3

Código	Hospedero sp	Hospedero var	Depart.	Localidad	Corregimiento o Vereda	Propietario del cultivo	a.s.n.m	HM	Genotipo
7200	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	La Laguna	Alto San Pedro	Sixto Guerrero	2849	<i>IIa</i>	EC-1
7201	<i>S. tuberosum</i>	Roja	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	Jaime Caicedo	2790	<i>IIa</i>	EC-1
7202	<i>S. tuberosum</i>	Capira	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	Humberto Lopez	2787	<i>IIa</i>	EC-1
7204	<i>S. phureja</i>	Sin registro	Nariño	San Fernando	San Fernando Alto	Humberto Lopez	2787	<i>IIa</i>	EC-1
7205	<i>S. muricatum</i>	Variedad 1	Putumayo	Sibundoy	Bellavista	Rafael Medina	0	<i>Ib</i>	US-1
7207	<i>S. tuberosum</i>	Parda Andina	Putumayo	Sibundoy	Bellavista	Rafael Medina	0	<i>IIa</i>	EC-1

HM: Haplotipo mitocondrial determinado por PCR-RFLP; **SD:** Linaje clonal no determinado.

Anexo D. Hospederos evaluados en el estudio (cultivos, sintomatología y características microscópicas)

Solanum tuberosum.

a) Cultivos de *S. tuberosum* en Ipiales (Municipio de Nariño).



b) Sintomatología relacionada con la presencia de la enfermedad en *S. tuberosum*.



c) Morfología microscópica de *P. infestans* en *S. tuberosum*.



Solanum phureja.

a) Cultivos de *S. phureja* en Ipiales (Municipio de Nariño).



b) Sintomatología relacionada con la presencia de la enfermedad en *S. phureja*



c) Morfología microscópica de *P. infestans* en *S. phureja*.



Solanum lycopersicum.

a) Cultivos de *S. lycopersicum* devastado por la presencia del patógeno en Iles (Municipio de Nariño)



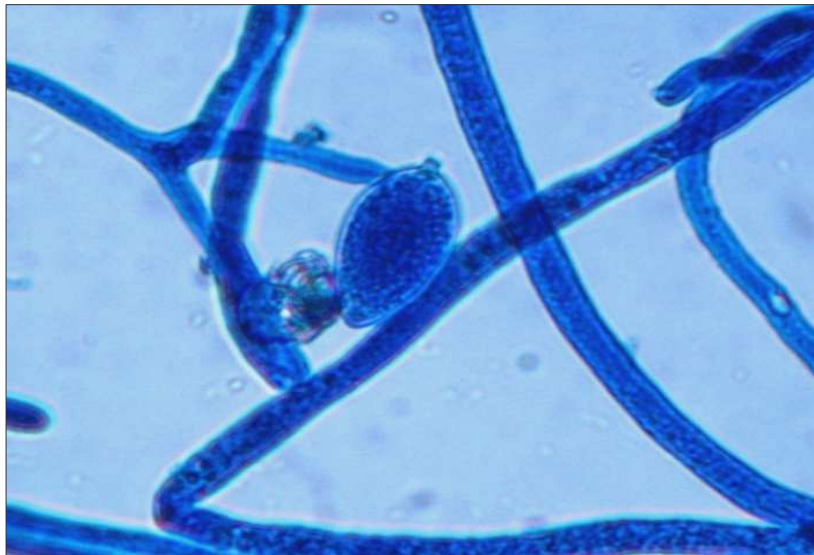
b) Sintomatología relacionada con la presencia de la enfermedad en tallo (*S. lycopersicum*)



c) Sintomatología relacionada con la presencia de la enfermedad en fruto (*S. lycopersicum*)



d) Morfología microscópica de *P. infestans* en *S. lycopersicum*



Solanum betaceum.

a) Cultivos de *S. betaceum* devastado por la presencia del patógeno en Sibundoy (Municipio de Putumayo)



b) Sintomatología relacionada con la presencia de la enfermedad en tallo (*S. betaceum*)



c) Sintomatología relacionada con la presencia de la enfermedad en hoja (*S. betaceum*)



d) Morfología microscópica de *P. andina* en *S. betaceum*.



Solanum quitoense.

a) Cultivos de *S. quitoense* devastado por la presencia del patógeno en Sibundoy (Municipio de Putumayo)



b) Sintomatología relacionada con la presencia de la enfermedad (*S. quitoense*)



c) Morfología microscópica de poblaciones de *Phytophthora* en *S. quitoens* tomada directamente de la hoja



Solanum muricatum.

a) Plantas de *S. muricatum* con evidencias de la presencia del patógeno en Sibundoy (Municipio de Putumayo)



b) Morfología microscópica de poblaciones de *Phytophthora* en *S. muricatum*.



Capsicum spp. (Hospedante evaluados sin síntomas de la enfermedad).

a) Fotografías de *Capsicum spp.* encontrado en Sibundoy (Putumayo)



Physalis spp. (Hospedante evaluados sin síntomas de la enfermedad).

a) Fotografías de *Physalis spp.* encontrado en La Laguna (Nariño)



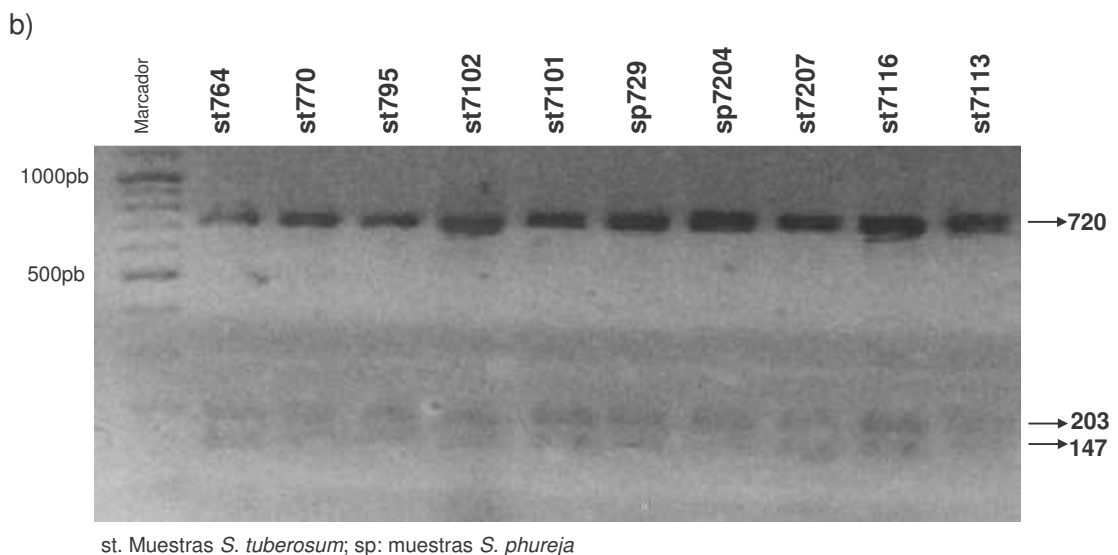
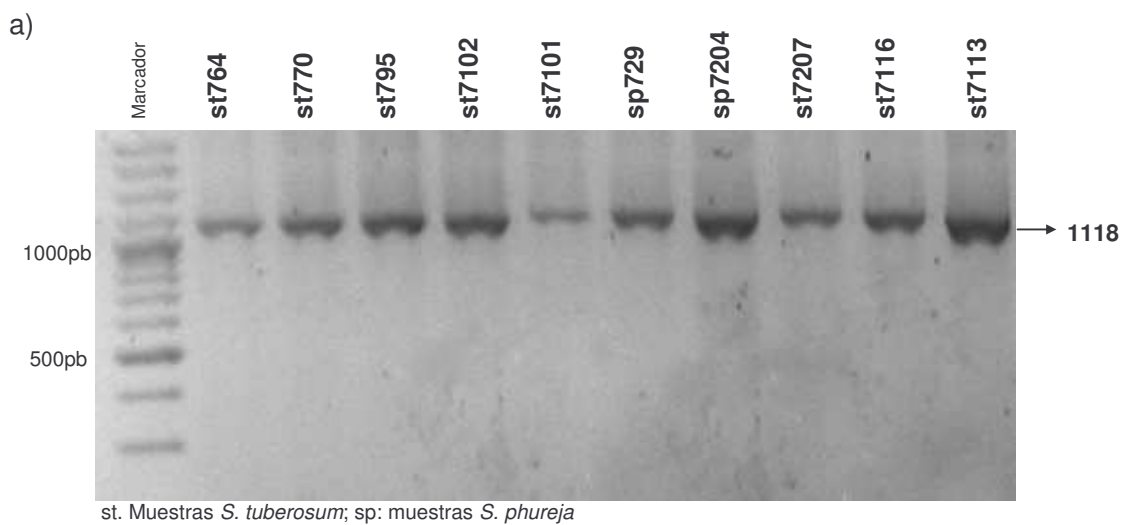
S. sibundoyensis. (Hospedante evaluados sin síntomas de la enfermedad).

a) Fotografías de *S. sibundoyensis* encontrado en Sibundoy (Putumayo)



Anexo E. Haplotipos mitocondriales para cada uno de los hospederos evaluados^{4,5}

Figura 1. Haplotipo mitocondrial IIa encontrado en *S. tuberosum* y *S. phureja*. a) Digestión de la región P1 con la enzima *CfoI*, la figura muestra ausencia de digestión para esta región; b) Digestión de la región P2 digerido con la enzima *MspI* donde se muestran fragmentos de 720, 203 y 147 pb; c) Digestión de la región P4 digerido con la enzima *EcoRI* donde se muestran fragmentos de 603,361pb.



⁴ Los datos de cada una de las muestras que aparecen en los geles se especifican en el anexo A.

⁵ Las muestras evaluadas en cada gel se encuentran en negrilla.

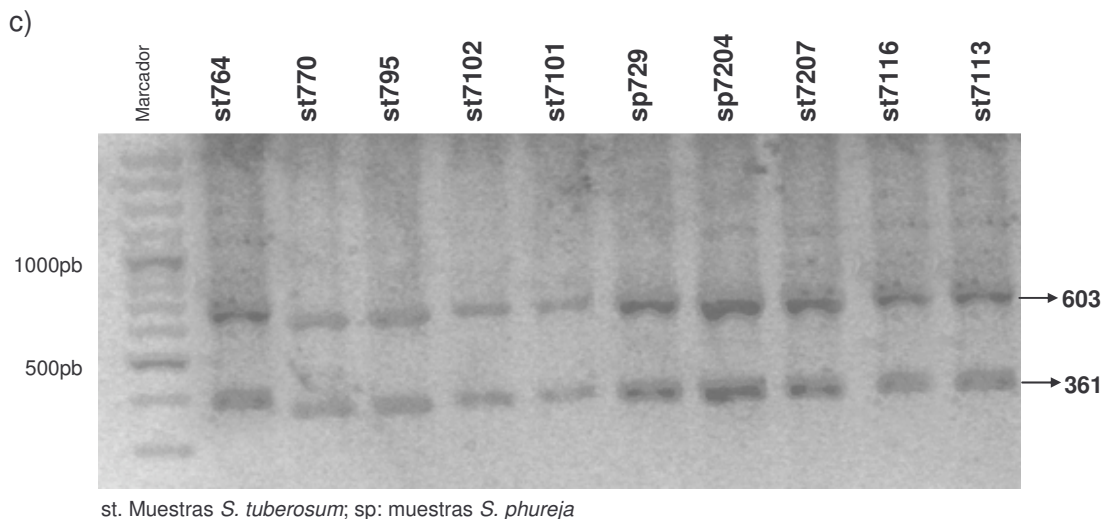
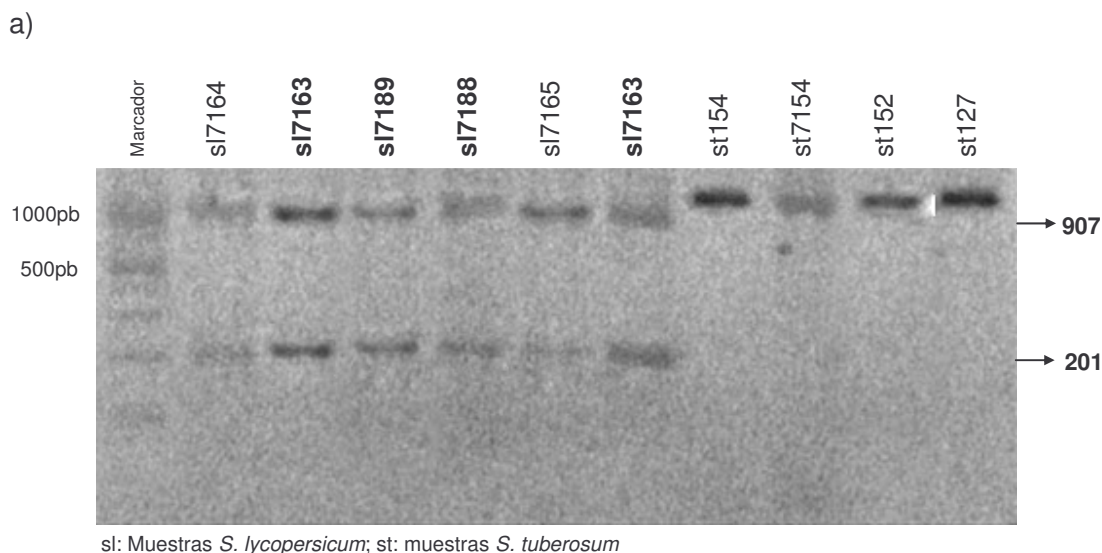
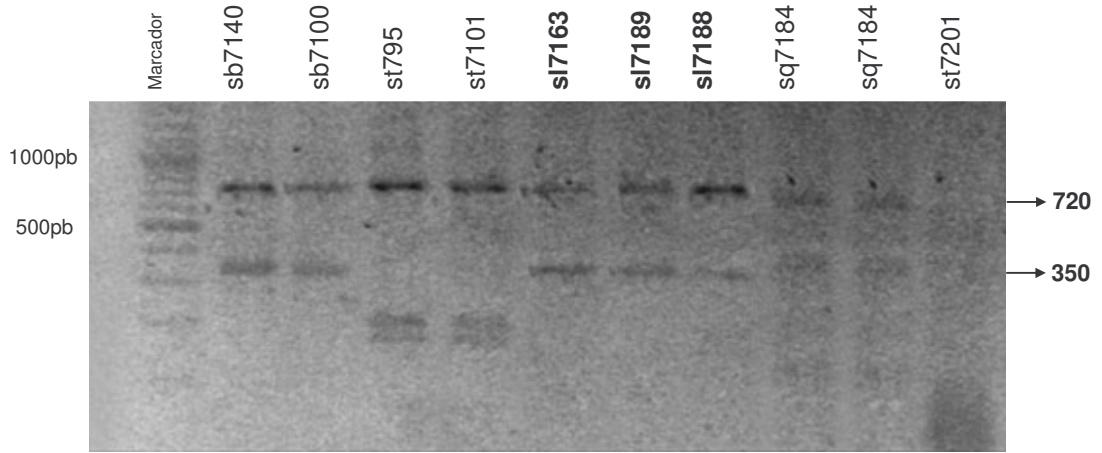


Figura 2. Haplotipo mitocondrial la encontrado en *S. lycopersicum*. a) Digestión de la región P1 con la enzima *CfoI*, la figura muestra la presencia de dos fragmentos 907 y 201pb⁶; b) Digestión de la región P2 digerido con la enzima *MspI* donde se muestran fragmentos de 720 y 350 pb; c) Digestión de la región P4 digerido con la enzima *EcoRI* donde se muestran fragmentos de 394, 361, 209pb.



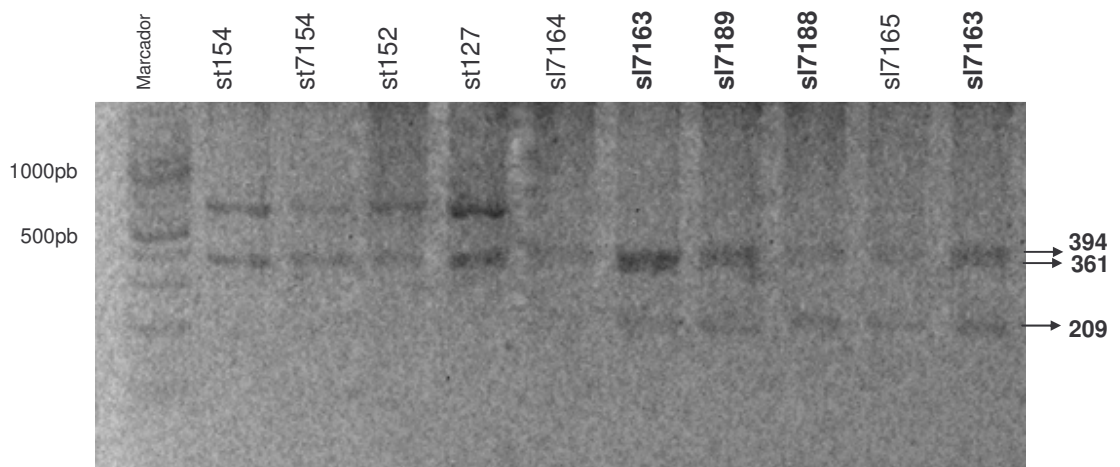
⁶ Las muestras de *S. tuberosum* se usaron para efectos de comparación

b)



sb: Muestras *S. betaceum*; st: muestras *S. tuberosum*; sl: muestras *S. lycopersicum*; Sq: muestras *S. quitoense*

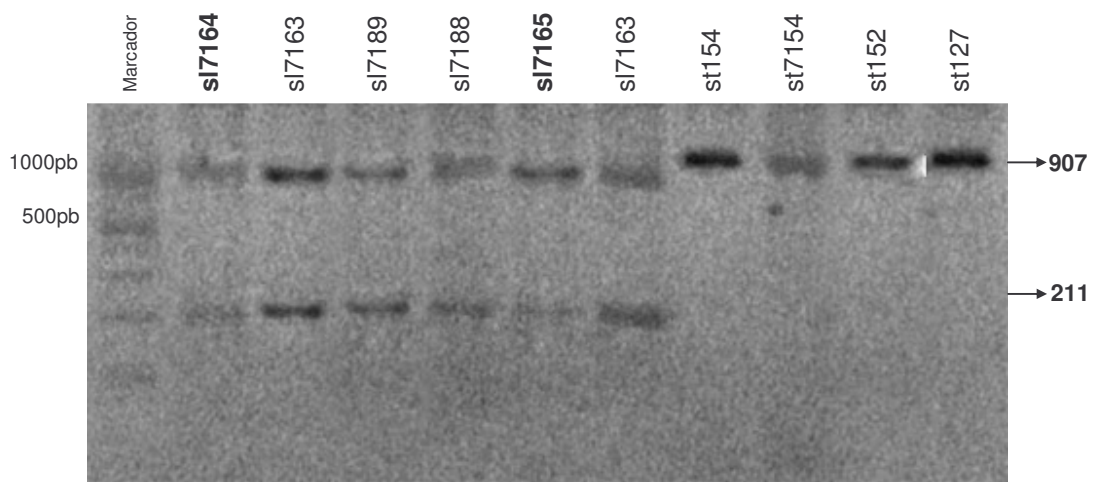
c)



st: muestras *S. tuberosum*; sl: muestras *S. lycopersicum*

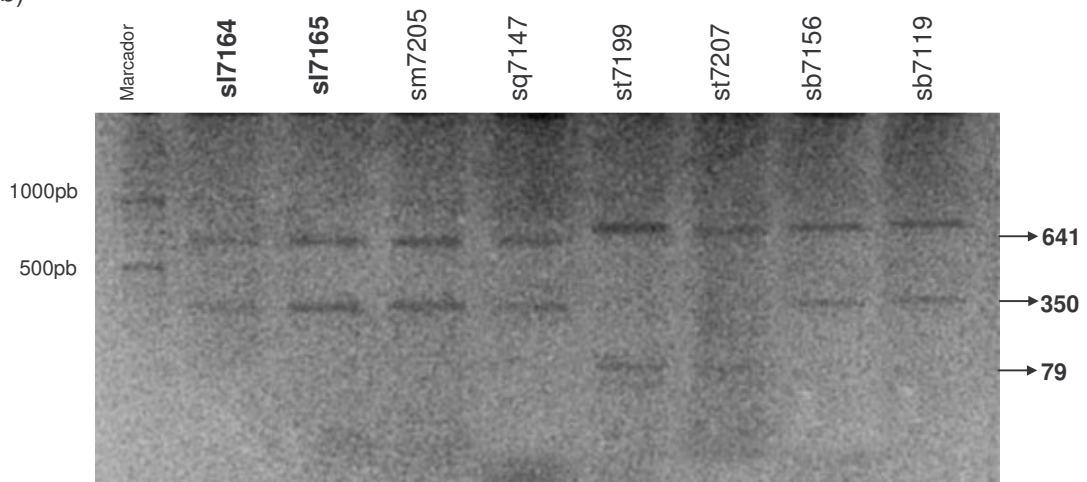
Figura 3. Haplotipo mitocondrial Ib encontrado en *S. lycopersicum*. a) Digestión de la región P1 con la enzima *CfoI*, la figura muestra fragmentos iguales de 907 y 211pb; b) Digestión de la región P2 digerido con la enzima *MspI* donde se muestran fragmentos de 641, 350, 79pb; c) Digestión de la región P4 digerido con la enzima *EcoRI* donde se muestran fragmentos de 394, 361 y 209pb.

a)



sl: muestras *S. lycopersicum*; st: muestras *S. tuberosum*

b)



sl: muestras *S. lycopersicum*; Sm: *S. muricatum*; Sq: muestras *S. quitoense*; St: muestras *S. tuberosum*; sb: muestras *S. betaceum*

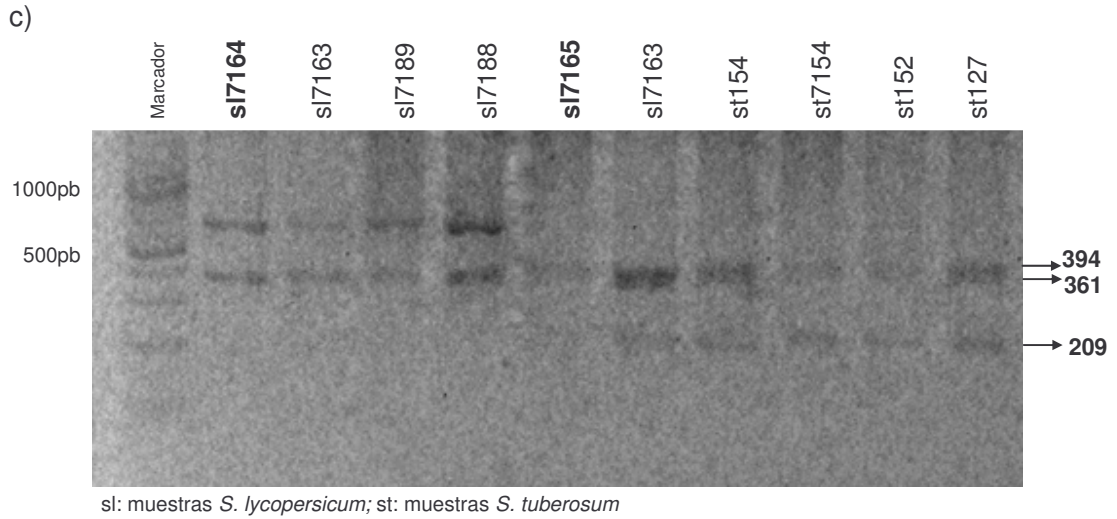
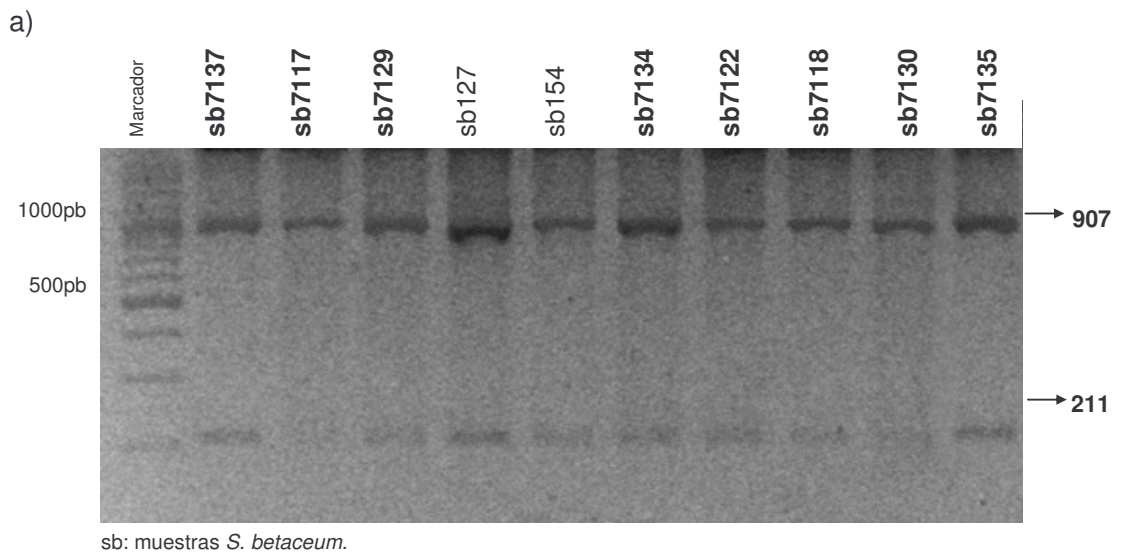


Figura 4. Haplotipo mitocondrial la encontrado en *S. betaceum*. a) Digestión de la región P1 con la enzima *CfoI*, la figura muestra los fragmentos 907 y 211pb; b) Digestión de la región P2 digerido con la enzima *MspI* donde se muestran fragmentos de 720 y 350pb; c) Digestión de la región P4 digerido con la enzima *EcoRI* donde se muestran fragmentos de 394, 361, 209pb.



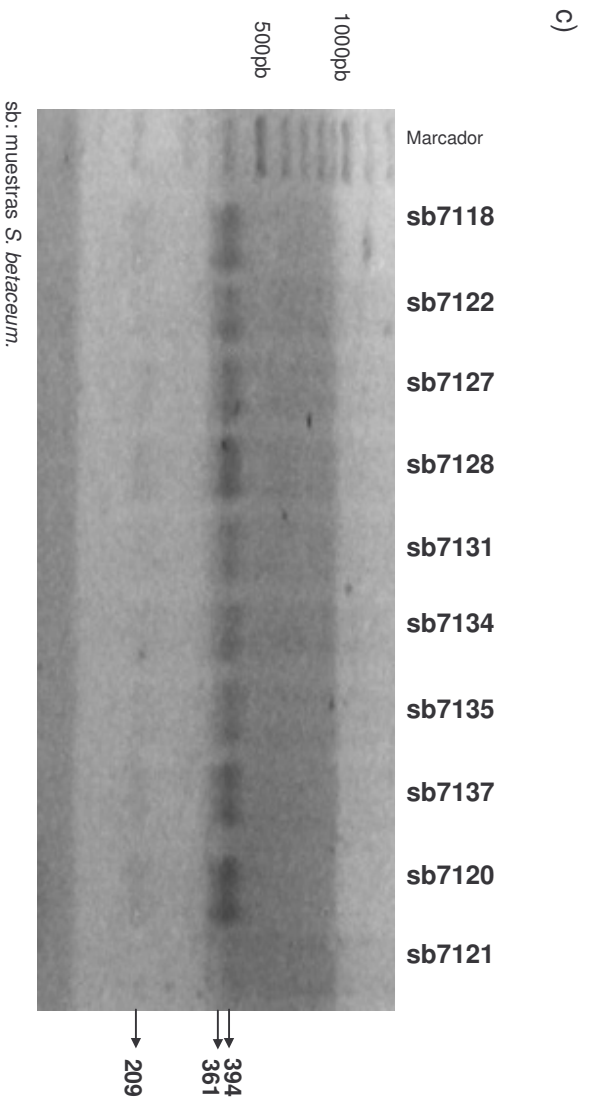
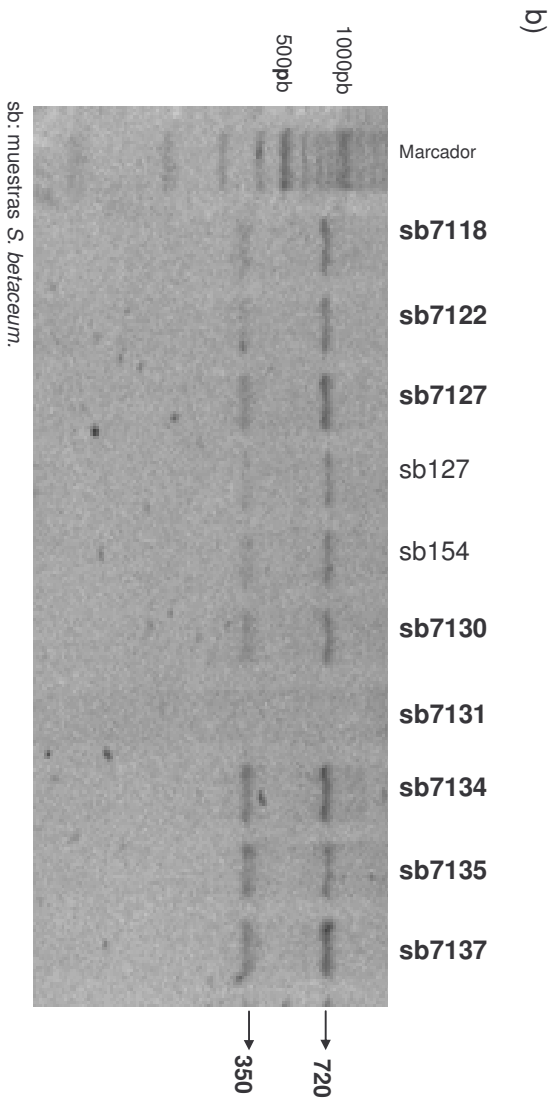
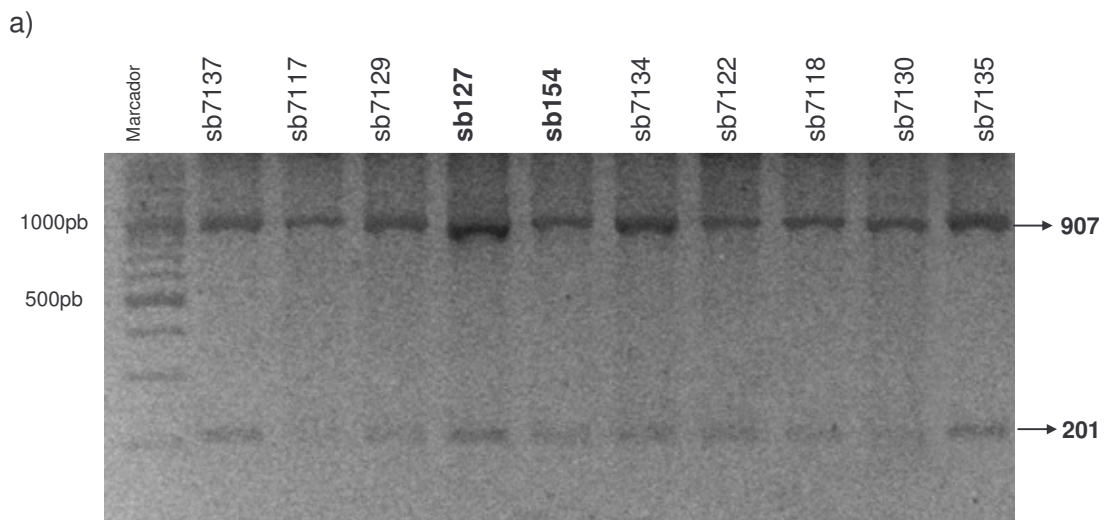
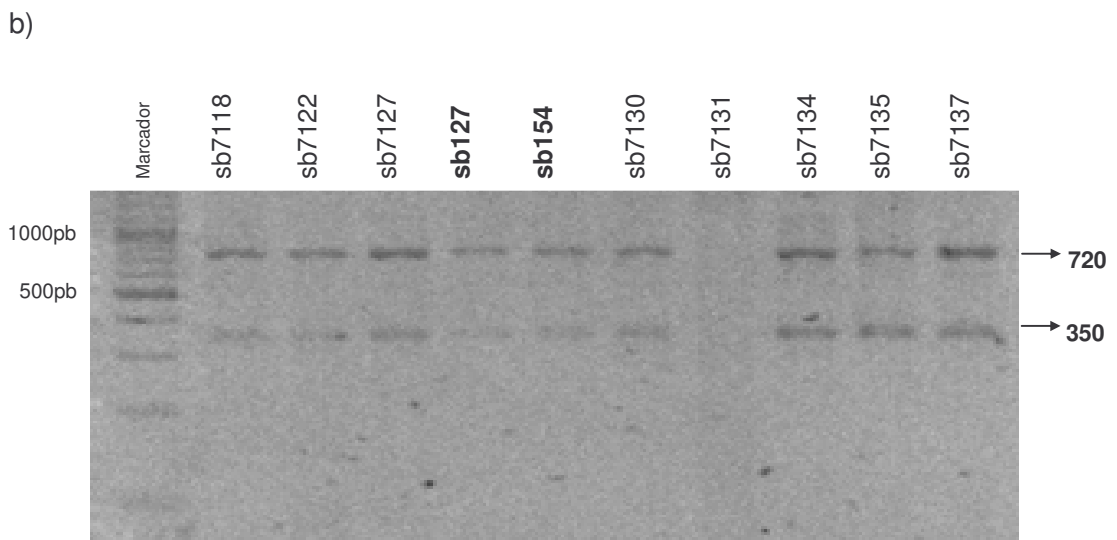


Figura 5. Haplotipo mitocondrial *Hsb-I* encontrado en *S. betaceum*. a) Digestión de la región P1 con la enzima *CfoI*, la figura muestra digestión del amplificado con fragmentos iguales a 907 y 211 pb; b) Digestión de la región P2 digerido con la enzima *MspI* donde se muestran fragmentos de 720 y 350pb; c) Digestión de la región P4 digerido con la enzima *EcoRI* donde se muestran fragmentos de 900,603,394,361,209pb.



sb: muestras *S. betaceum*.



sb: muestras *S. betaceum*.

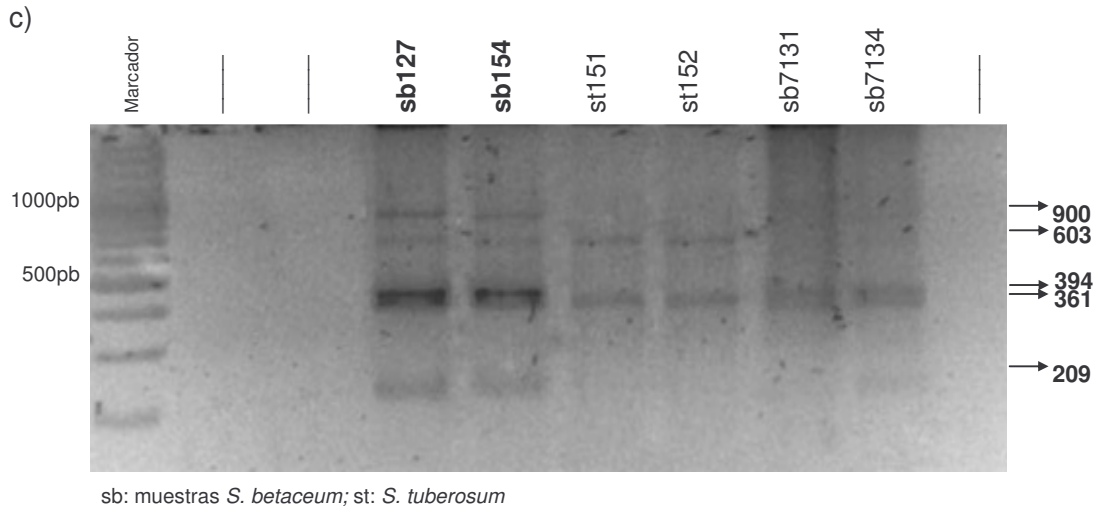
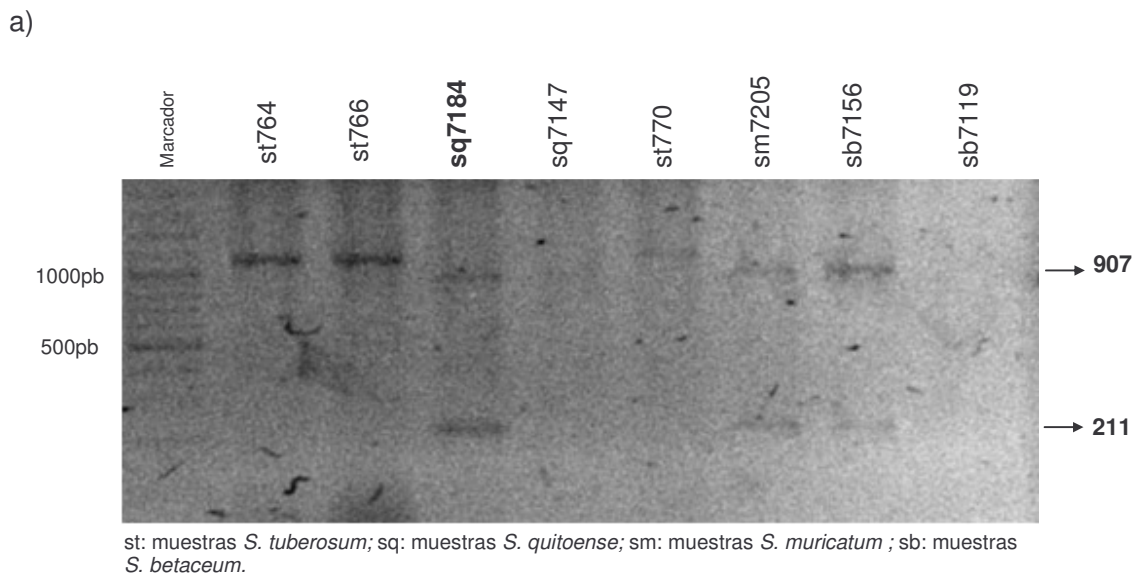
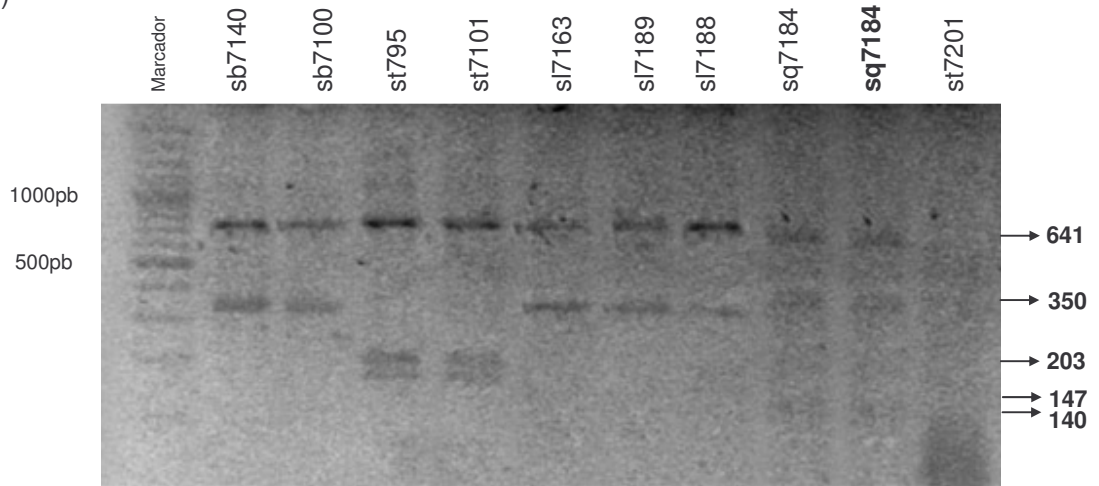


Figura 6. Haplotipo mitocondrial *Hsq-I* encontrado en *S. quitoense*. a) Digestión de la región P1 con la enzima *CfoI*, la figura muestra digestión de la muestra y la generación de dos fragmentos 907 y 211pb; b) Digestión de la región P2 digerido con la enzima *MspI* donde se muestran fragmentos de 641-350-203-147pb aproximadamente; c) Digestión de la región P4 digerido con la enzima *EcoRI* donde se muestran fragmentos de 394, 361, 209pb.

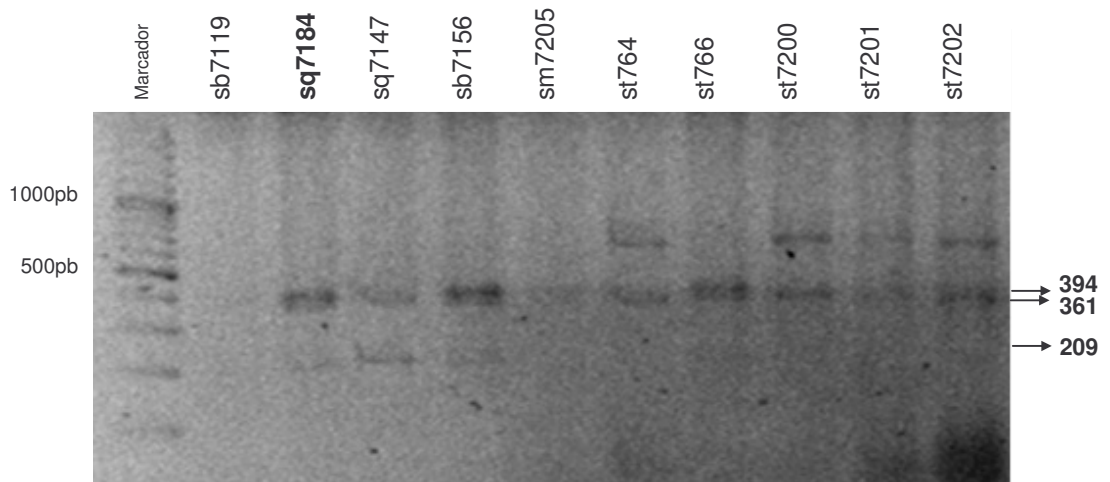


b)



sb: muestras *S. betaceum*; st: muestras *S. tuberosum*; sl: muestras *S. lycopersicum*; sq: muestras *S. quitoense*.

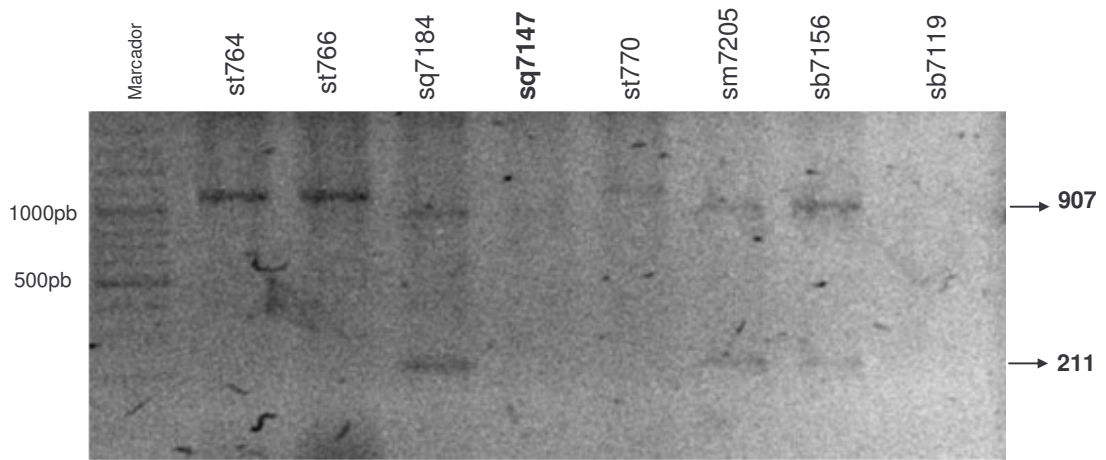
c)



sb: muestras *S. betaceum*; sq: muestras *S. quitoense*; sb: muestras *S. betaceum*; sm: muestras *S. muricatum*; st: muestras *S. tuberosum*;

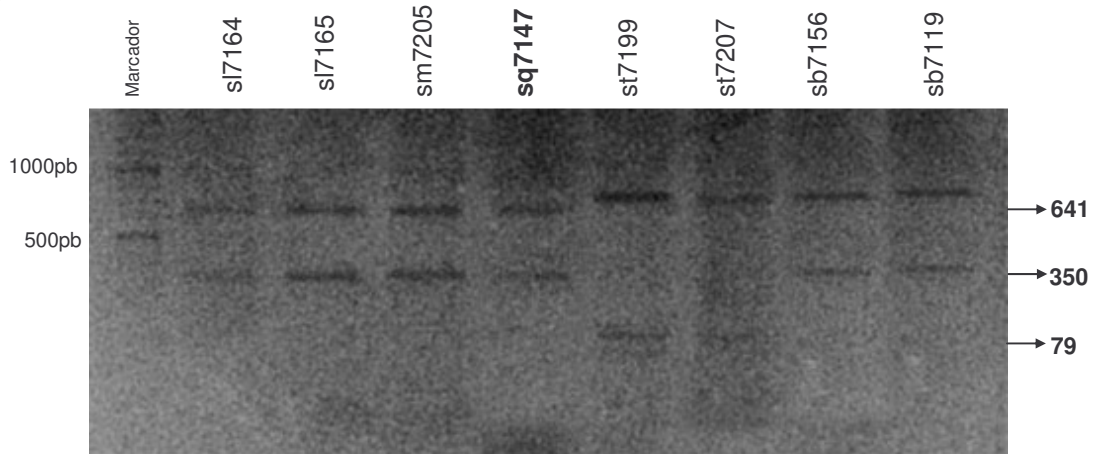
Figura 7. Haplotipo mitocondrial *Hsq-II* encontrado en *S. quitoense*. a) Se muestra ausencia de amplificado y digestión para la región P1 después de digestión con la enzima *CfoI*; b) Digestión de la región P2 digerido con la enzima *MspI* donde se muestran fragmentos de 641, 350, 79pb; c) Digestión de la región P4 digerido con la enzima *EcoRI* donde se muestran fragmentos de 394,361, 209pb.

a)



st: muestras *S. tuberosum*; sq: muestras *S. quitoense*; sm: muestras *S. muricatum* ; sb: muestras *S. betaceum*.

b)



sl: muestras *S. lycopersicum*; Sm: *S. muricatum*; Sq: muestras *S. quitoense*; St: muestras *S. tuberosum*; sb: muestras *S. betaceum*

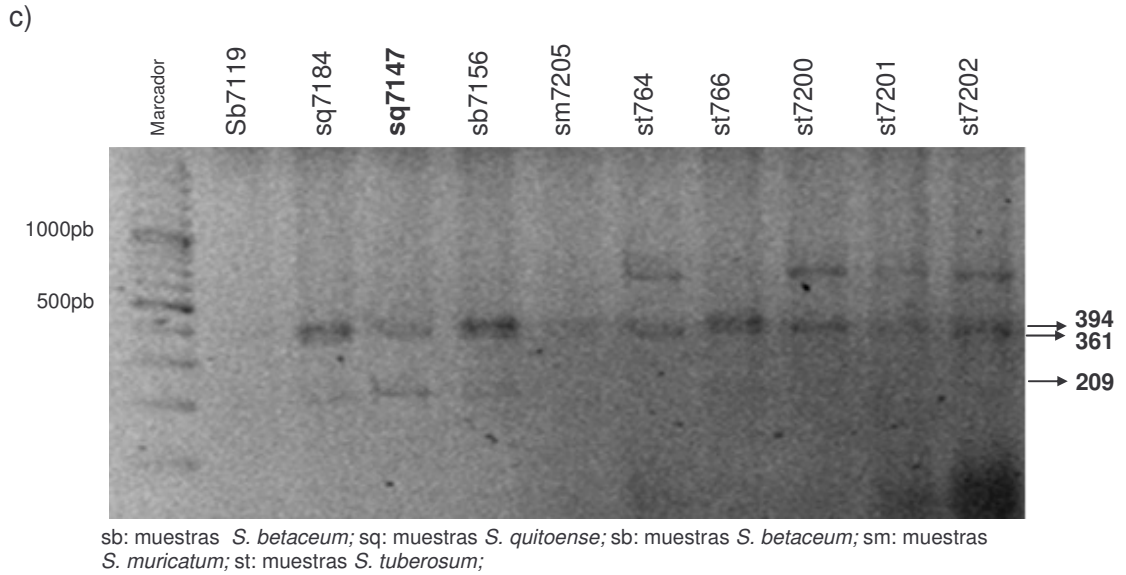
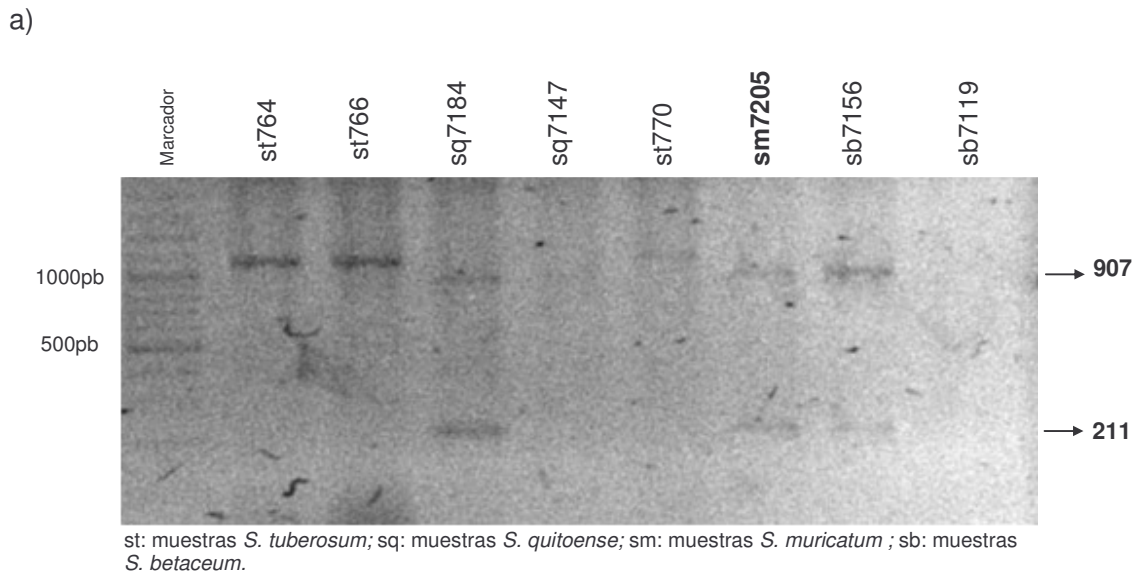
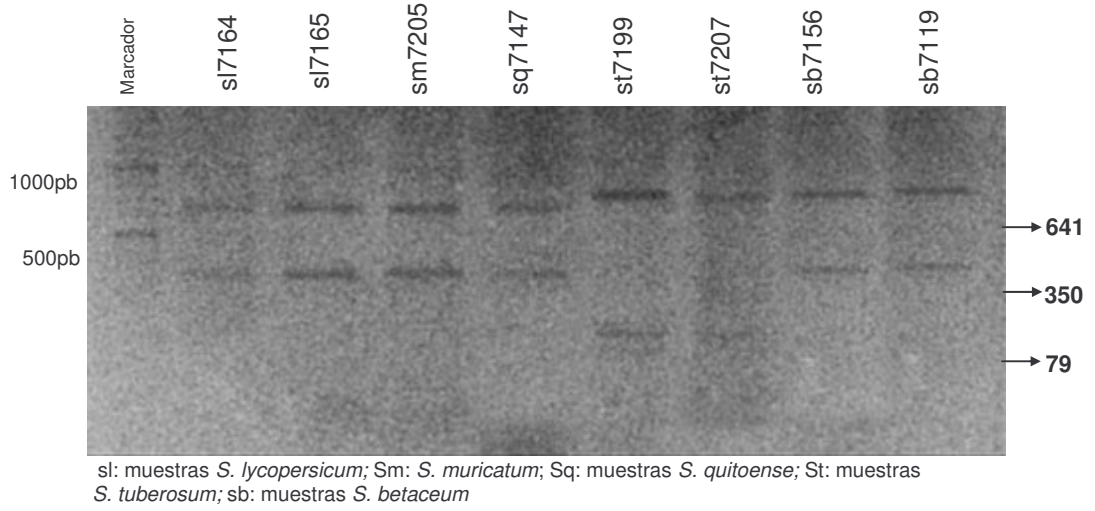


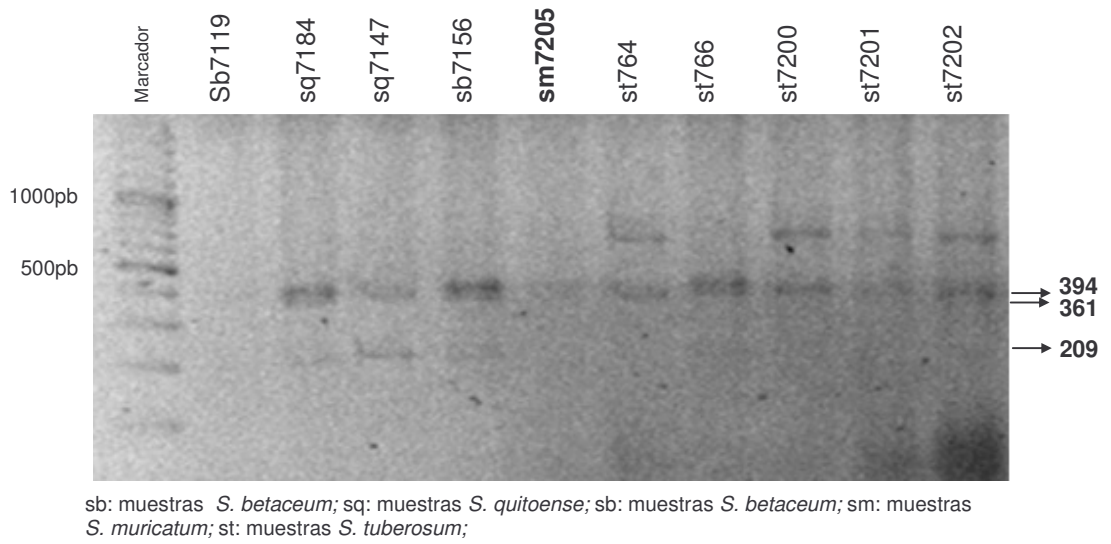
Figura 8. Haplotipo mitocondrial Ib encontrado en *S. muricatum*. a) Digestión de la región P1 con la enzima *CfoI*, la figura muestra dos fragmentos después de la digestión 907 y 211pb; b) Digestión de la región P2 digerido con la enzima *MspI* donde se muestran fragmentos de 641, 350, 79pb; c) Digestión de la región P4 digerido con la enzima *EcoRI* donde se muestran fragmentos de 394,361,209pb.



b)



c)



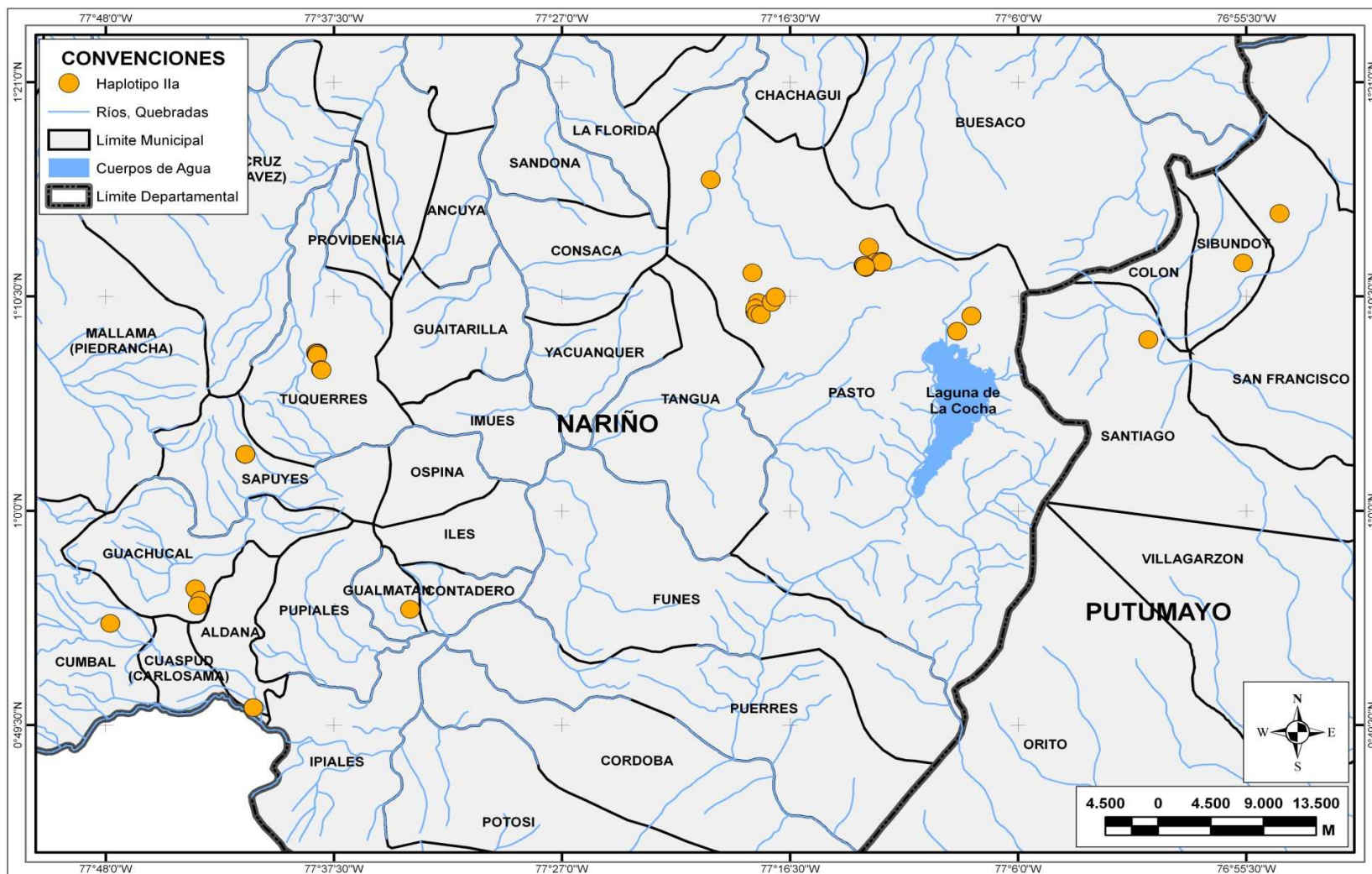
Anexo F. Frecuencias y porcentajes de los genotipos más comunes encontrados en diferentes especies de solanáceas en los departamentos de Nariño y Putumayo.

POSIBLE LÍNEA CLONAL	HAPLOTIPO MITOCONDRIAL	Papa (<i>S. tuberosum</i>)	Pepino (<i>S. muricatum</i>)	Papa (<i>S. phureja</i>)	Tomate de Árbol (<i>S. betaceum</i>)	Tomate de Mesa (<i>S. lycopersicum</i>)	Lulo (<i>S. quitoense</i>)
EC-1	Ila	20 (100%)	-	4 (100%)	-	-	-
EC-3	Ia	-	-	-	17 (85%)	-	-
US-1	Ib	-	1 (100%)	-	-	2 (40%)	-
Sin determinar	Ia	-	-	-	-	3 (60%)	-
Sin determinar	Hsb- ^a	-	-	-	3 (15%)	-	-
Sin determinar	Hsq- ^b	-	-	-	-	-	1 (50%)
Sin determinar	Hsq- ^b	-	-	-	-	-	1 (50%)
TOTAL		20 (100%)	1 (100%)	4 (100%)	20 (100%)	5 (100%)	2 (100%)
MUESTRAS EVALUADAS		20 (100%)	1 (100%)	4 (100%)	20 (100%)	5 (100%)	2 (100%)

^a Similitud con el haplotipo mitocondrial Ib para los primers F2-R2 y F4-R4

^b Codificación asignada para efectos de análisis

Anexo G. Mapas incluidos en el estudio donde se especifican los puntos de muestreo y el haplotipo encontrado para cada uno de ellos.



Proyecto:
Caracterización Genética de
Phytophthora en Nariño y Putumayo

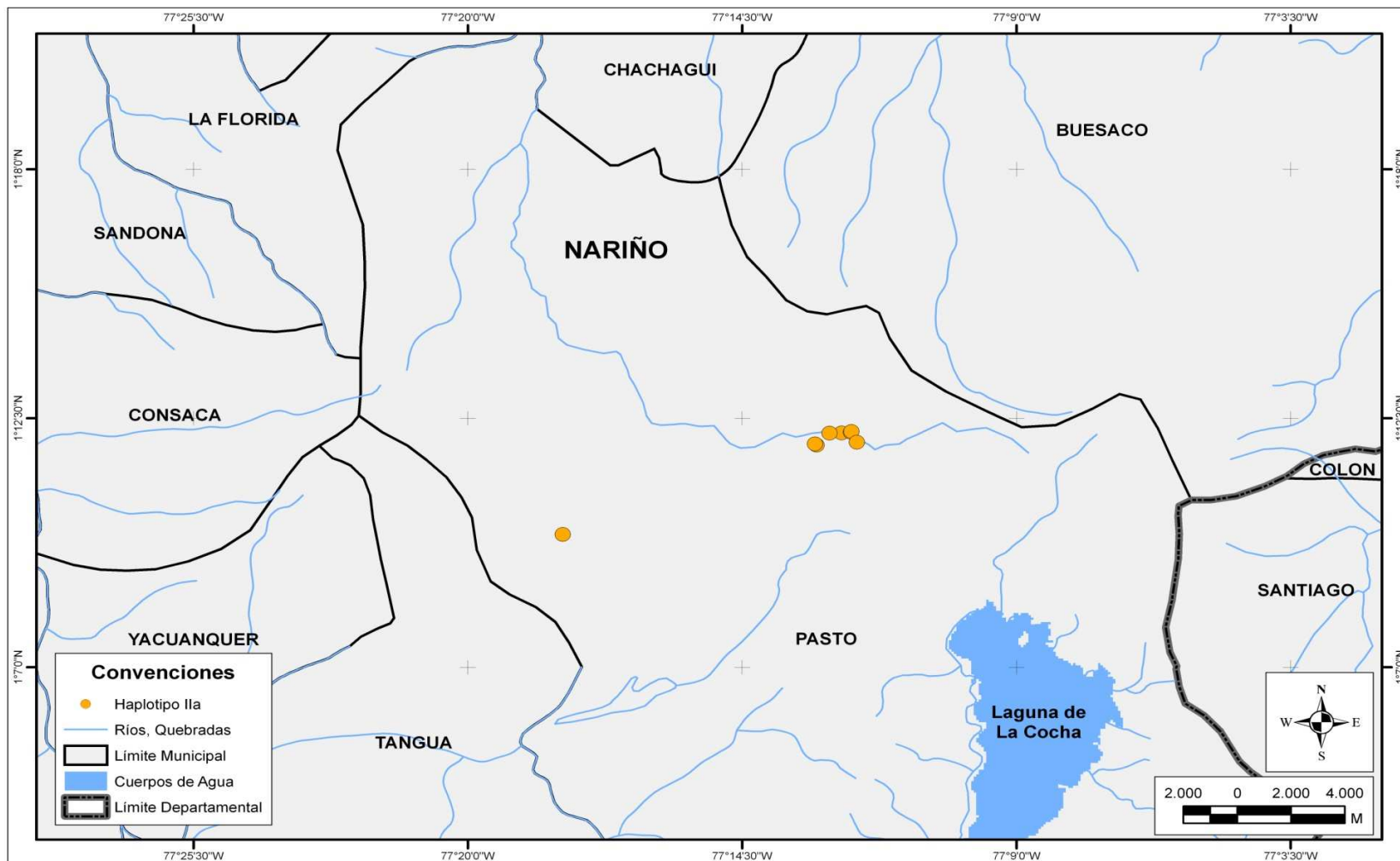
Distribución Haplotipos
en *Solanum tuberosum*

Escala:
1:450.000

Fuente:
Bióloga María Fernanda Mideros
Grupo Genética de Patosistemas
Universidad de Nariño

Elaboró:
Geog. Mauricio Sarmiento Pancho

Mapa No:
3



Proyecto:
Caracterización Genética de
Phytophthora en Nariño y Putumayo

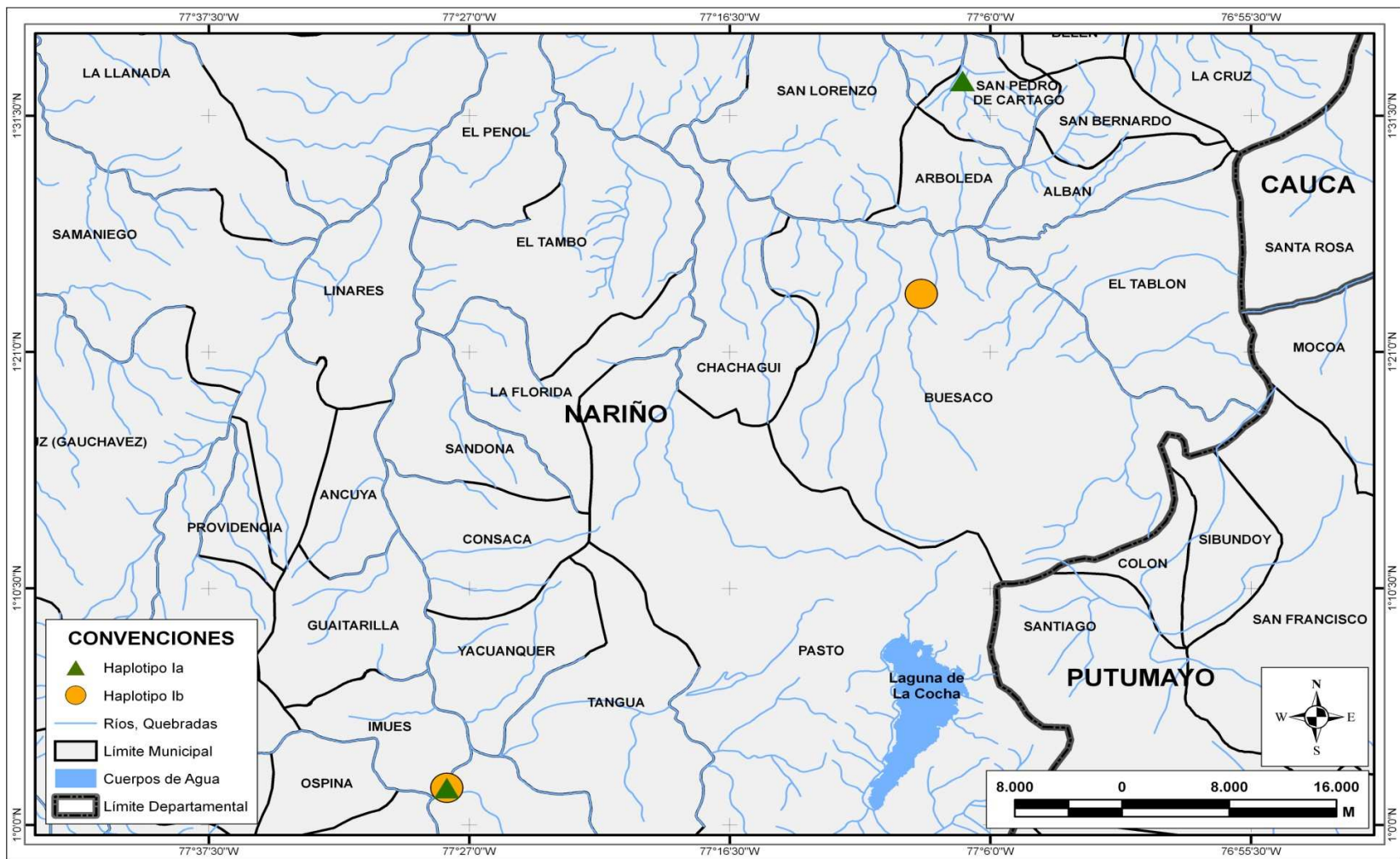
Distribución Haplotipos
en *Solanum Phureja*

Escala:
1:200.000

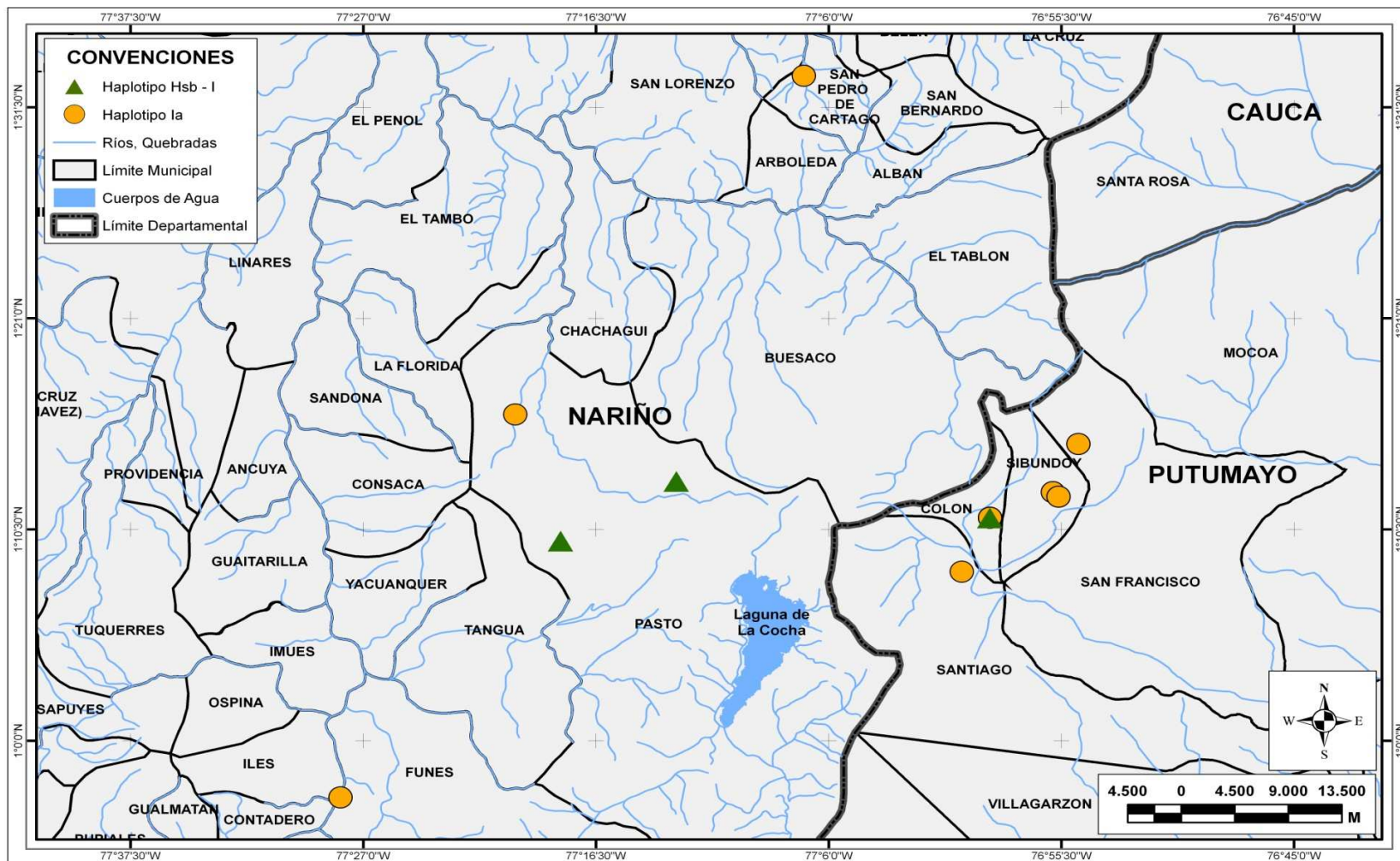
Fuente:
Bióloga María Fernanda Mideros
Grupo Genética de Patosistemas
Universidad de Nariño

Elaboró:
Geog. Mauricio Sarmiento Pancho

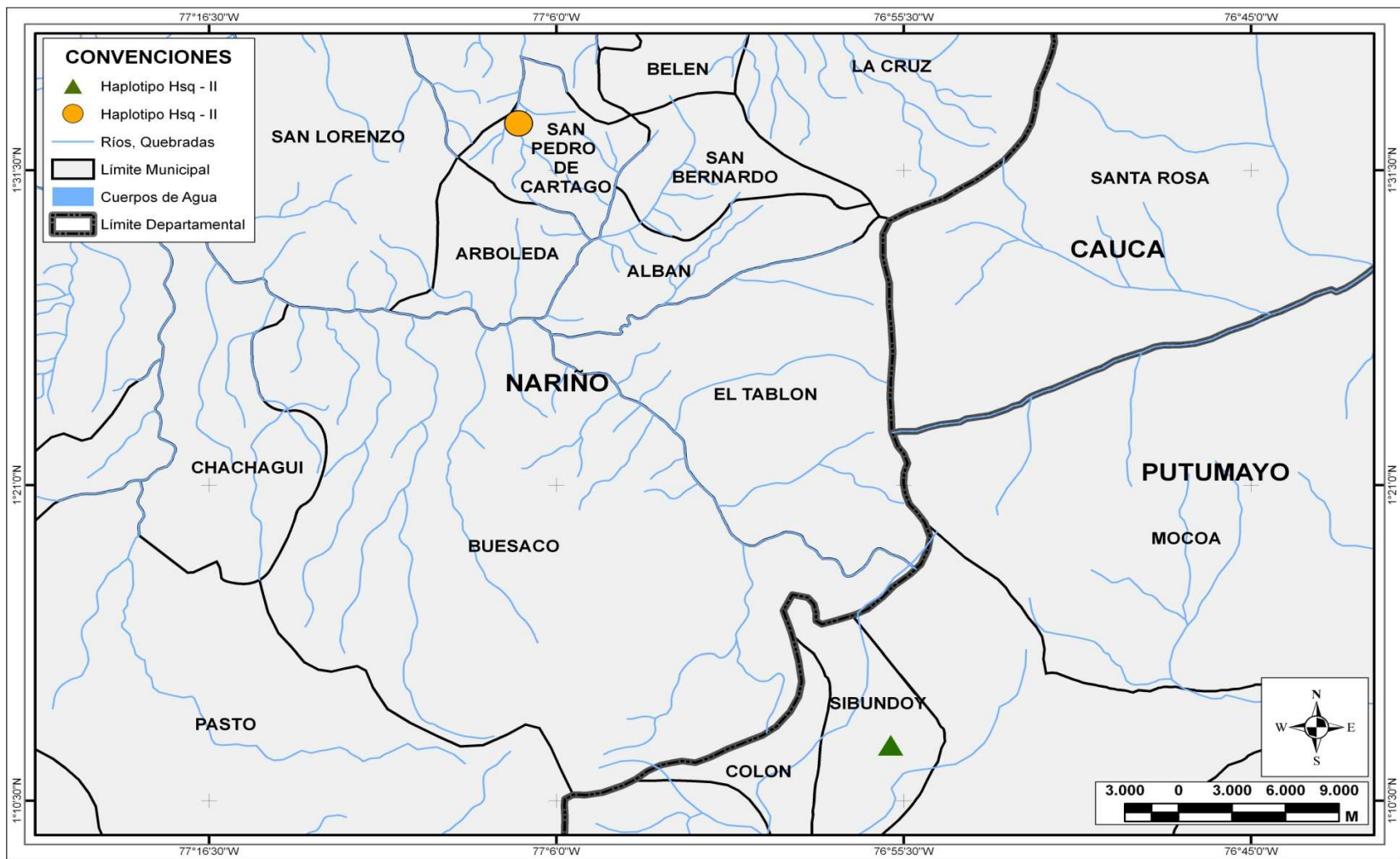
Mapa No:
4



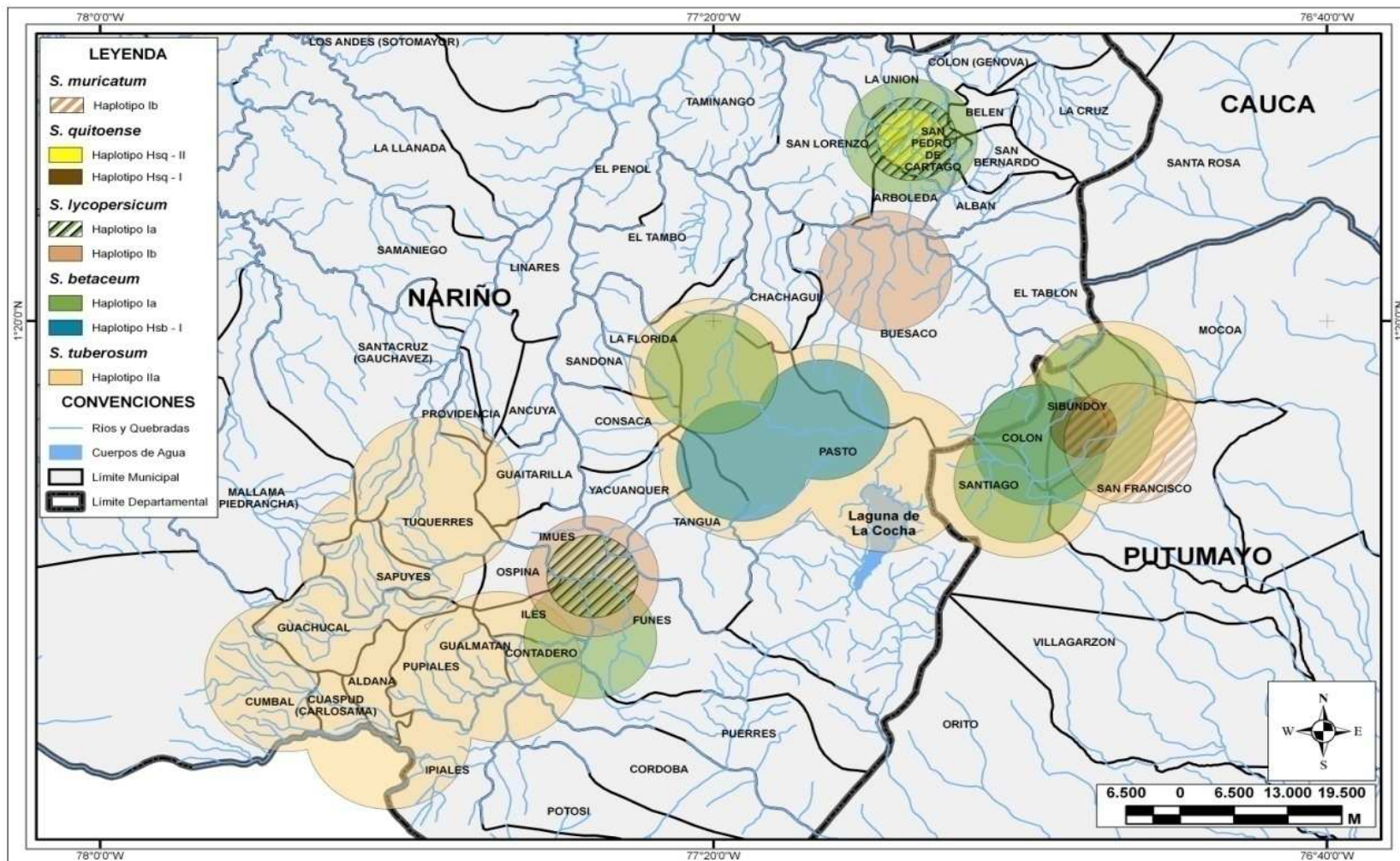
Proyecto: Caracterización Genética de <i>Phytophthora</i> en Nariño y Putumayo	Distribución Haplotipos en <i>Solanum lycopersicum</i>	Escala: 1:400.000	Fuente: Bióloga María Fernanda Mideros Grupo Genética de Patosistemas Universidad de Nariño	Elaboró: Geog. Mauricio Sarmiento Pancho	Mapa No: 5
--	--	-----------------------------	---	--	-----------------------------



Proyecto: Caracterización Genética de <i>Phytophthora</i> en Nariño y Putumayo	Distribución Haplotipos en <i>Solanum betaceum</i>	Escala: 1:450.000	Fuente: Bióloga María Fernanda Mideros Grupo Genética de Patosistemas Universidad de Nariño	Elaboró: Geog. Mauricio Sarmiento Pancho	Mapa No.: 6
--	--	-----------------------------	---	--	------------------------------



Proyecto: Caracterización Genética de <i>Phytophthora</i> en Nariño y Putumayo	Distribución Haplotipos en <i>Solanum quitoense</i>	Escala: 1:300.000	Fuente: Bióloga María Fernanda Mideros Grupo Genética de Patosistemas Universidad de Nariño	Elaboro: Geog. Mauricio Sarmiento Pancho	Mapa No: 7
--	---	-----------------------------	---	--	-----------------------------



Proyecto:
 Caracterización Genética de
Phytophthora en Nariño y Putumayo

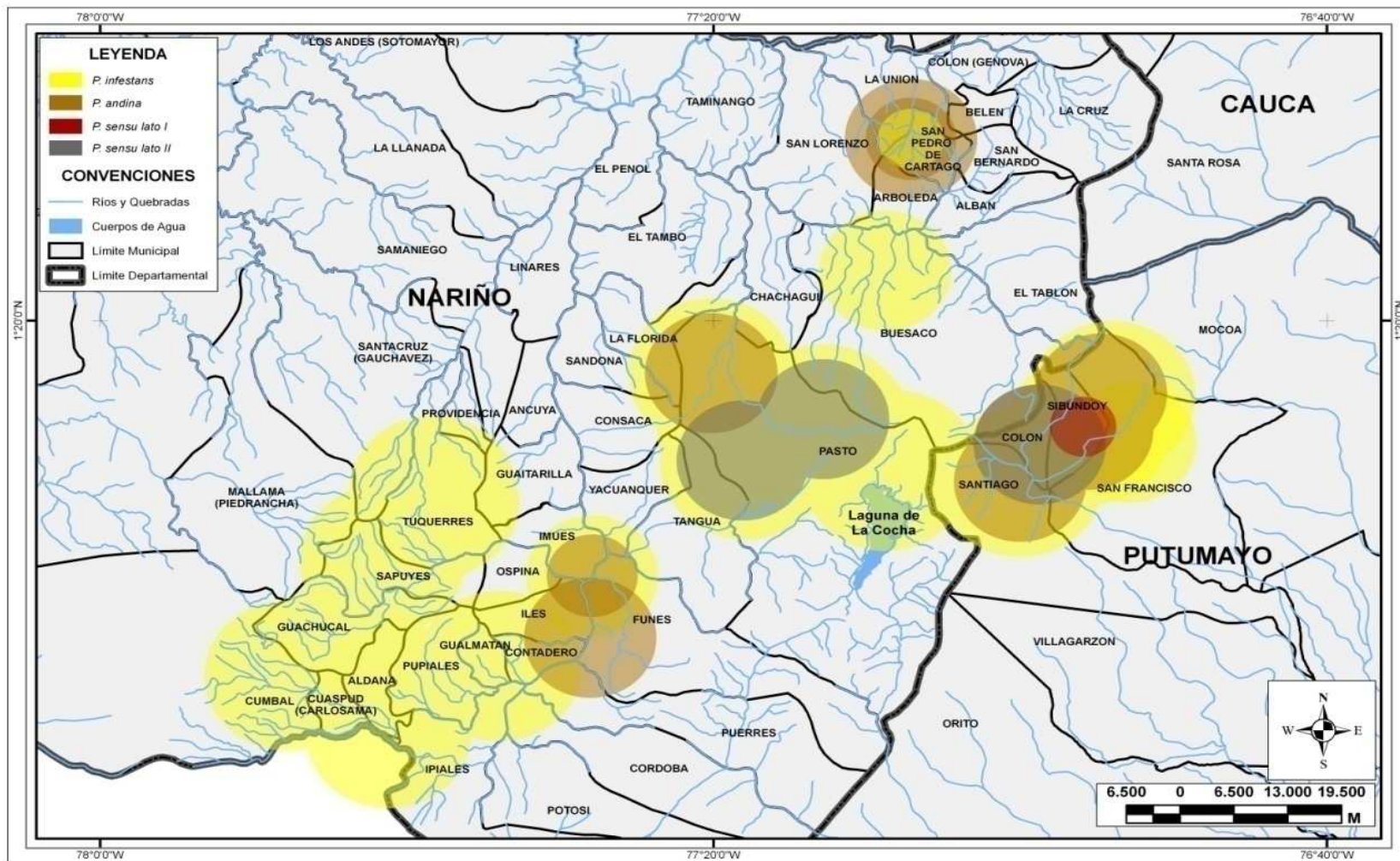
Distribución Haplotipos

Escala:
 1:650.000

Fuente:
 Bióloga María Fernanda Mideros
 Grupo Genética de Patosistemas
 Universidad de Nariño

Elaboro:
 Geog. Mauricio Sarmiento Pancho

Mapa No:
 9



Proyecto: Caracterización Genética de <i>Phytophthora</i> en Nariño y Putumayo	Distribución Complejo <i>Phytophthora</i>	Escala: 1:650.000	Fuente: Bióloga María Fernanda Mideros Grupo Genética de Patosistemas Universidad de Nariño	Elaboro: Geog. Mauricio Sarmiento Pancho	Mapa No: 10
--	---	-----------------------------	---	--	---