PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización morfológica y determinación del tipo de apareamiento en aislamientos del patógeno *Phytophthora andina* presente en cultivos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en el Ecuador

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias Biológicas

ERIKA BELÉN CAICEDO AUCAPIÑA

Quito, 2018

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Erika Belén Caicedo Aucapiña ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

María Eugenia Ordóñez Maldonado, Ph.D
Directora de la Disertación
Quito, 26 de noviembre de 2018

DEDICATORIA

A mi padre, Roberto Caicedo.

Por su esfuerzo, sacrificio y apoyo constante. Gracias por darme el regalo de la educación.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia por su apoyo y por estar siempre presentes sin importar la distancia.

A Estefany Vaca por ser más que una amiga, una hermana y por estar conmigo incondicionalmente en los buenos y malos momentos.

A David Espinel, por alegrar mis días y por haber compartido conmigo este largo camino.

A Mariu Ordóñez por permitirme ser parte del equipo del Fungario y guiarme a lo largo de este proyecto. A Gabriela Chacón por todo su conocimiento y apoyo en la realización de este trabajo. A Juan Anzieta por brindarme un poco de su tiempo y ayuda.

A Alessio, Jorge y Nelson por brindarme su conocimiento, y permitirme descubrir las maravillas del mundo de los hongos. A Ricardo Zambrano por siempre escucharme y aconsejarme.

Al Centro Internacional de la Papa por la donación de las muestras control. A Marcelo Vinueza por entrenarme en el aislamiento exitoso de *Phytophthora*. A todos los ingenieros y profesores de diferentes entidades por su ayuda durante las salidas de campo.

A todos los agricultores que nos permitieron acceder a sus plantaciones para poder llevar a cabo este estudio.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento para este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN……1

2. ABSTRACT……...2

3. INTRODUCCIÓN……..3

OBJETIVOS..... ……..8

OBJETIVO GENERAL 8

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 8

4.MATERIALES Y MÉTODOS……... 9

4.1. COLECCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL PATÓGENO 9

4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y TASA DE CRECIMIENTO..... 10

4.2.1. CARACTERES MACROSCÓPICOS 10

4.2.2. CARACTERES MICROSCÓPICOS 10

4.2.3. TASA DE CRECIMIENTO 11

4.3. ANÁLISIS DE TIPO DE APAREAMIENTO..... 12

5. RESULTADOS……13

5.1. COLECCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL PATÓGENO..... 13

5.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y TASA DE CRECIMIENTO 15

5.2.1. CARACTERES MACROSCÓPICOS Y MICROSCÓPICOS 15

5.2.2. TASA DE CRECIMIENTO 20

5.3. ANÁLISIS DE TIPO DE APAREAMIENTO..... 21

6. DISCUSIÓN……23

6.1. COLECCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL PATÓGENO..... 23

6.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA ……..24

6.3. TASA DE CRECIMIENTO 26

6.4. ANÁLISIS DE TIPO DE APAREAMIENTO..... 26

7. CONCLUSIONES……29

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……30

9. ANEXOS……..35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hoja de *Solanum betaceum* con síntomas de tizón 13

Figura 2. Proceso de aislamiento para la obtención de cultivos puros de *P. andina* a partir de hojas de *S. betaceum*. 13

Figura 3. Morfología de las colonias de *Phytophthora andina* después de 15 días de incubación en cuatro medios de cultivo.. 16

Figura 4. Morfología microscópica de *Phytophthora andina*. 17

Figura 5. Crecimiento de *P. andina* a 21 °C en cuatro diferentes medios de cultivo. 20

Figura 6. Gráfico de regresión lineal para medio de cultivo TTA usando intervalos de confianza e intervalos de predicción al 95%. ..... …21

Figura 7. Morfología de gametangios y oósporas de cruces entre muestras de *P. andina* y *P. andina* EC3190 de tipo de apareamiento A2.. 22

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número de aislamientos puros de *Phytophthora andina* obtenidos por localidad por provincia. 14

Tabla 2. Descripción microscópica de 26 aislamientos puros de *Phytophthora andina* en medio TTA. 18

Tabla 3. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para el tamaño de los esporangios. ... 19

Tabla 4. Resultado de la prueba de Scheirer Ray Hare para tasas de crecimieno de *P. andina* según medio de cultivo, localidad de origen e interacción de medio de cultivo-localidad.. 20

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de superficie plantada, cosechada y producida, de tomate de árbol en Ecuador, según región y provincia. 36

Anexo 2. Formulario de muestreo 37

Anexo 3. Protocolos de medios de cultivo utilizados. 38

Anexo 4. Esquema de ensayo de tipo de apareamiento. 40

Anexo 5. Mapa de ubicación de las localidades muestreadas para *P. andina* en *S. betaceum* 40

Anexo 6. Descripción macroscópica de 26 aislamientos puros de *P. andina* en cuatro diferentes medios de cultivo 41

1. RESUMEN

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) es una planta ampliamente cultivada en la Sierra, y de gran importancia económica para pequeños y medianos agricultores en el Ecuador. Plagas y enfermedades se encuentran entre los principales problemas del cultivo en las zonas tomateras del país. Entre estos, el fitopatógeno *Phytophthora andina* ha sido descrito en estudios previos, como el agente causal del tizón en tomate de árbol en Ecuador y Perú el cual puede causar pérdidas, incluso totales, de los cultivos. Los análisis de la población del patógeno en tomate de árbol en el Ecuador datan de hace 10 años, y recientemente se reportó el tipo de apareamiento A2 en Perú, lo cual es un riesgo para el cultivo de tomate de árbol en el Ecuador. En el presente estudio se utilizaron marcadores fenotípicos macroscópicos y microscópicos, y la determinación del tipo de apareamiento, para identificar posibles cambios en la población de *P. andina* en tomate de árbol en los últimos 10 años en el Ecuador. Para esto se obtuvieron cultivos puros del patógeno a partir de hojas infectadas de tomate de árbol de cinco provincias del Ecuador. Se evaluó la tasa de crecimiento, morfología macroscópica de la colonia, morfología de caracteres microscópicos como esporangióforos, esporangios, hifas primarias, gametangios y oósporas, y además, se analizó el tipo de apareamiento. Se encontraron diferencias con la descripción previa de *P. andina* en cuanto al patrón de crecimiento de la colonia, su tasa de crecimiento, y el largo y la relación largo/ancho de los esporangios. También se encontraron diferencias morfológicas importantes con la especie recién descrita como causante de tizón en tomate de árbol en Colombia, *P. betacei*. No existieron cambios en el tipo de apareamiento determinado como A1, sin embargo, se deben realizar estudios genéticos para determinar si existe una reproducción sexual o asexual en la población del patógeno. Basado en los resultados de este estudio se concluyó que existen ciertas diferencias morfológicas entre la población analizada hace 10 años y la población actual de *P. andina*, pero no ha habido cambios en cuanto al tipo de apareamiento. Es importante seguir monitoreando la población del patógeno para diseñar métodos adecuados de manejo de la enfermedad en campo.

Palabras clave: caracterización fenotípica, oomicete, *Phytophthora andina*, tipo de apareamiento, tomate de árbol.

2. ABSTRACT

Tree tomato (*Solanum betaceum Cav.)* is a widely-cultivated plant in the Andean highlands, and of great economic importance for small and medium scale farmers in Ecuador. Pests and diseases are among the main problems in tree tomato growing areas of the country. Among these, the plant pathogen *Phytophthora andina* has been described in previous studies, as the causal agent of blight disease in tree tomato in Ecuador and Peru, which can cause complete crop losses. Analysis of the population of the pathogen in tree tomato in Ecuador dates back 10 years, and recently the A2 mating type has been reported in Peru, which poses a threat to tree tomato cultivation in Ecuador. In this study, morphological characteristics, such as macroscopic and microscopic markers, and mating type determination were used to identify changes that could have occurred in the *P. andina* population in Ecuador in the last 10 years. Pure cultures of the pathogen were obtained from infected tree tomato leaves from five provinces in Ecuador. Growth rate, macroscopic colony morphology, morphology of microscopic characters such as sporangiophores, sporangia, primary hyphae, gametangia and oospores were evaluated, and mating type was analyzed. Differences were found with the previous description of *P. andina* regarding the growth pattern of the colony, growth rate, and the length and length-to-breadth ratio of the sporangia. Important morphological differences were also found with the newly described species of blight in tree tomato in Colombia, *P. betacei*. There was no change in mating type, determined as A1, however, genetic studies must be carried out to establish if sexual or asexual reproduction is occurring in the pathogen population. Based on the results of this study, it was concluded that there are certain morphological differences between the population analyzed 10 years ago and the current population of *P. andina*, but no changes in mating type have occurred. It is important to continue to monitor the pathogen population in order to improve management methods of the disease in the field.

Keywords: mating type, oomycete, phenotypic characterization, *Phytophthora andina*, tree tomato.

3. INTRODUCCIÓN

El filo Oomycota, clasificado en el clado Stramenopila dentro del reino Chromista, es un grupo de organismos ampliamente distribuidos que comprende especies saprófitas y parásitas (Kroon, Bakker, Van Den Bosch, Bonants y Flier, 2004). Previamente, los Oomycota fueron erróneamente clasificados en el reino Fungi por ser organismos microscópicos con hifas filamentosas y ausencia de clorofila (Agrios, 2005), pero posteriormente fueron ubicados dentro del reino Chromista por no poseer las principales características de los hongos verdaderos que son: pared celular de quitina y glucanos, hifas mayormente septadas y forma de almacenamiento de energía como glucógeno (Agrios, 2005; Volk, 2001). Dentro de los Oomycota, los fitopatógenos filamentosos pertenecientes al género *Phytophthora* causan enfermedades en una gran variedad de hospederos de importancia agrícola y en la naturaleza (Raffaele y Kamoun, 2012; Mideros et al., 2018). Dentro de la familia Solanaceae pueden infectar a *Solanum tuberosum* (papa), *S. lycopersicum* (tomate riñón), *S. betaceum* (tomate de árbol), *S. muricatum* (pepino dulce), *S. quitoense* (naranjilla), *Physalis peruviana* (uvilla) y especies silvestres de *Solanum* (Cárdenas et al., 2011). Estudios recientes, especialmente en tomate de árbol, son relevantes, dada la creciente aceptación del fruto en los mercados internacionales, lo que provocaría un aumento en la producción y la necesidad de inocuidad del fruto (Castaño Monsalve, Ramírez Gil, Patiño Hoyos y Morales Osorio, 2015).

Solanum betaceum Cav. es una planta nativa de la región andina sudamericana, que se cultiva en varios países de América Central, América del Sur, Asia, África y Oceanía (Ramírez-Gil, Gil-Aguirre y Morales-Osorio, 2017). Crece en zonas templadas a frías, con un rango de temperatura óptimo de 14 °C a 20 °C, y una precipitación anual entre 500-3500 mm (Sistema de Información del Agro, 2016), preferiblemente en suelos ricos en materia orgánica con un pH óptimo de 6,5 a 7 (Revelo, Pérez y Maila, 2004b). Es una planta arbustiva de dos a tres metros de altura, con tallo y ramas semileñosas de color verde grisáceo; hojas grandes cordadas, alternas, de color verde oscuro (dependiendo de la variedad), levemente pubescentes en el envés y con nervación marcada; las flores son pequeñas, de color rosado y se agrupan en racimos axilares o terminales de hasta 40 flores; los frutos son bayas de forma variable ovalados, ovoides o esféricos, carnosos y con cáscara delgada y lisa; el color del fruto y de la pulpa varían entre amarillo, naranja y rojo

dependiendo de la variedad de tomate de árbol (León, Viteri y Cevallos, 2004; Revelo et al., 2004b; Calvo, 2009; Osorio, 2013). A pesar de que no existe una clasificación clara de las variedades de tomate de árbol, a partir de información aportada por los agricultores, se distinguen tres principales variedades comerciales: Amarillo gigante, Amarillo común y la variedad Mora (Revelo, Mora y Reyes, 2004a). La producción y exportación del tomate del árbol se ha incrementado en los últimos años principalmente en Nueva Zelanda, Ecuador y Colombia (Ramírez-Gil et al., 2017), como consecuencia de la gran demanda del fruto por sus propiedades nutricionales y su sabor, para ser consumido como fruta fresca o ser usado como materia prima en procesos agroindustriales (Niño Palacio y Cotrino Sarmiento, 2015).

En el Ecuador, el tomate de árbol es cultivado principalmente en la Sierra y es de gran importancia económica para pequeños y medianos agricultores, aunque también se lo cultiva en algunas provincias del Oriente, pero tradicionalmente la mayor producción se ha concentrado en Tungurahua e Imbabura (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2016). En el 2017 se sembraron 3862 ha de tomate de árbol y se cosecharon 1925 ha, con una producción de 20212 toneladas de fruta fresca. La mayor producción se registró en Tungurahua, con 8910 toneladas (Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2017) (Anexo 1). El tomate de árbol se comercializa principalmente en el mercado local, pero desde julio de 2018 se permitió la importación del fruto fresco a Estados Unidos de América, lo que posiblemente resultaría en un aumento en la producción a nivel nacional en los próximos años. Su cultivo presenta limitantes como la dificultad en distinguir entre sus variedades, problemas en procesos de riego, cosecha y postcosecha, uso indiscriminado de agroquímicos, reemplazo de variedades locales por extranjeras y, principalmente, el manejo de plagas y enfermedades (León et al., 2004; Acosta Quezada, 2011).

Una de las principales enfermedades del tomate de árbol en el Ecuador es el tizón o lancha, presente en todas las zonas tomateras del país. En zonas templadas a frías y con alta humedad relativa la enfermedad puede ser más agresiva (León et al., 2004; Revelo, Mora, Gallegos y Garcés, 2008). En Ecuador y Perú, *Phytophthora andina* se ha descrito como el agente causal (Forbes et al., 2013), mientras que en Colombia recientemente se describió a la nueva especie *P. betacei* como el causante de tizón tardío en cultivos de tomate de árbol en ese país (Mideros et al., 2018). Ambas especies atacan los tejidos de hojas y tallos en plantas jóvenes, y el follaje y ramillas en plantas adultas (Revelo et al., 2008), ocasionan lesiones necróticas rodeadas de áreas de consistencia acuosa en los tallos y manchas

redondeadas negruzcas o cafés en las hojas que, bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, forman halos de esporulación de color blanquecino (Revelo et al., 2008; Forbes et al., 2013). Aunque todas las variedades de tomate de árbol son susceptibles a la enfermedad, existen diferencias en el tamaño de las lesiones de acuerdo con la variedad, siendo la variedad Amarillo común la menos susceptible (Revelo et al., 2004b).

A nivel mundial, las poblaciones de *Phytophthora* han sido caracterizadas en base a marcadores fenotípicos y genotípicos como morfología de la colonia, resistencia a fungicidas, preferencia de hospedero, tipo de apareamiento, haplotipo mitocondrial (Ia, Ib, Ic, IIa y IIb), patrón RFLP, análisis de alozimas y microsatélites (Carter, Archer, Buck, Shaw y Shattock, 1990; Griffith y Shaw, 1998; Peters, Platt y Hall, 1999; Gavino y Fry, 2002; Danies, Small, Myers, Childers y Fry, 2013). En el Ecuador se conoce que existen tres linajes de *P. andina* llamados EC-2, EC-2.1 y EC-3, pero únicamente este último ataca al tomate de árbol (Adler et al., 2004; Chacón Acosta, 2007; Oliva et al., 2010). El linaje clonal EC-3 se caracteriza por tener un tipo de apareamiento A1, patrón RFLP EC-3 y haplotipo mitocondrial Ia (Adler et al., 2004; Oliva et al., 2010). En base a marcadores fenotípicos y moleculares, se ha encontrado similitudes entre las poblaciones del patógeno en Colombia y Ecuador. En Colombia se ha encontrado el linaje clonal EC-3, un patrón RFLP CO-1 y tipo de apareamiento A1 (Mideros et al., 2011; Forbes, Gamboa, Lindqvist-Kreuze, Oliva y Pérez, 2016). En Perú, la población de *P. andina* en tomate de árbol es genéticamente distinta a la población del patógeno en Ecuador, presentando tipo de apareamiento A2, patrón RFLP PE-8 y haplotipo mitocondrial Ic (Forbes et al., 2016). En el Ecuador se han encontrado los dos tipos de apareamiento, A1 y A2. El tipo de apareamiento A1 está principalmente en cultivos de papa, tomate riñón, y tomate de árbol, mientras que el tipo de apareamiento A2 ha sido hallado únicamente en pepino dulce y especies silvestres de solanáceas de la sección Anarrhichomenum: *Solanum brevifolium* y *S. tetrapetalum*. A pesar de que los dos tipos de apareamiento están presentes, no hay evidencia de reproducción sexual en la población del patógeno (Vargas et al., 2009; Oliva et al., 2010).

Phytophthora andina ha sido reportada únicamente en los Andes y fue descrita en base a colecciones y estudios realizados en el Ecuador (Ordóñez et al., 2000; Adler et al., 2004; Chacón Acosta, 2007; Oliva et al., 2010). Morfológicamente, *P. andina* presenta hifas no septadas de 4 - 8 µm de diámetro y de ramificación libre. Esporangióforos dispuestos en simpodios compuestos con hinchazones en la zona donde emergen los esporangios. Tiene

esporangios caducos, semipapilados, elipsoides o semi-ovoides, con medidas entre 39,5 – 62,5 x 14 – 24,8 µm, una relación largo/ancho del esporangio de 2,4 a 2,7, con pedicelos cortos y germinación directa (por tubo germinal) e indirecta (por liberación de zoósporas). Presenta un sistema de reproducción heterotálico, con producción de una a 160 oósporas (esporas sexuales) por mm^2. Las oósporas son esféricas, de color amarillento-café, con paredes externas gruesas, vacuola central grande y citoplasma translúcido, y miden entre 26,5 - 37,5 µm de diámetro. Los anteridios son anfígenos de largo promedio 22 µm. Los oogonios miden entre 34 - 41 µm de diámetro y tienen base atenuada (Oliva et al., 2010).

Phytophthora andina presenta dos tipos de apareamiento, A1 y A2, y se conoce que cada tipo de apareamiento por sí solo no produce oósporas en cultivo (Forbes, Gamboa, Lindqvist-Kreuze, Oliva, y Perez, 2016). La reproducción sexual solo ocurre cuando ambos tipos de apareamiento están presentes; uno de ellos desencadena la producción de hormonas que son receptadas por el otro tipo de apareamiento y permite el inicio del desarrollo de gametangios (oogonios y anteridios) de tipos opuestos resultando en la formación de una oospora (Páez, Valverde, Gómez y Brenes, 2004; Ko, 2007). Para esta especie es necesaria la co-estimulación de los dos tipos de apareamiento (A1 y A2) para la producción de estructuras sexuales (Oliva et al., 2010). La presencia de los dos tipos de apareamiento en una misma zona geográfica brinda la oportunidad para que se dé la reproducción sexual y un consecuente incremento en la variación genética de la población. Mayor variabilidad genética pudiera favorecer la adaptabilidad del patógeno a cambios ambientales, mayor patogenicidad, o resistencia a fungicidas u otras medidas de control en cultivo (Andersson, 2007).

Los últimos estudios sobre la población de *P. andina* en tomate de árbol en el Ecuador datan de hace 10 años, tiempo en el cual no se había identificado el tipo de apareamiento A2 en la población (Oliva et al., 2010), ni se conocía la presencia de una especie diferente de *Phytophthora* en tomate de árbol en Colombia (Mideros et al., 2018). Se desconoce si han ocurrido cambios en la población del patógeno desde entonces en el Ecuador. El presente estudio se enfocó en la caracterización morfológica y la determinación del tipo de apareamiento de la población de *P. andina* en cultivos de tomate de árbol en el Ecuador. Es importante conocer si el tipo de apareamiento A2 está presente en el país y si existen diferencias entre la población ecuatoriana del patógeno y las poblaciones en Colombia y Perú. La presencia del tipo de apareamiento A2 en el Perú (Forbes et al., 2016) implica un

potencial riesgo de interacción sexual con la población ecuatoriana A1 del patógeno, lo cual podría generar mayor variación genética en la población del patógeno. Una mayor variabilidad genética podría resultar en poblaciones más virulentas de tizón que podrían ocasionar grandes epidemias, poniendo en riesgo la producción de tomate de árbol en la región.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la morfología y tipo de apareamiento de poblaciones de *P. andina* en tomate de árbol (*S. betaceum*) en diferentes regiones productoras del Ecuador.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Colectar muestras de *P. andina* en zonas tomateras del país.
- Obtener aislados puros de las muestras colectadas de *P. andina* usando medios de cultivo selectivos.
- Analizar características morfológicas macro y microscópicas de los aislamientos de *P. andina*.
- Identificar el tipo de apareamiento de los aislamientos de *P. andina* mediante ensayos in vitro.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. COLECCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL PATÓGENO

La colección de muestras de *P. andina* se realizó entre febrero y mayo del 2018 en zonas de cultivo de tomate de árbol y jardines caseros, en las provincias de Pichincha, Tungurahua, Napo, Azuay e Imbabura, en un rango altitudinal entre 1260 y 2850 msnm. Se colectaron hojas de tomate de árbol con síntomas de tizón de campos que estuvieron separados por una distancia de al menos 1 km entre ellos, y cada campo se registró como una localidad. Cada colección se originó de una planta individual, y se obtuvieron entre una a tres muestras de uno a 10 árboles diferentes por campo. Cada muestra se colocó en una funda plástica inflada con aire y rotulada. De cada campo agrícola, cuando fue posible, se registró nombre del propietario, coordenadas geográficas, variedad de tomate de árbol, manejo agronómico del cultivo, es decir, irrigación y tratamientos con fungicidas incluyendo nombre comercial del producto, dosis y desempeño, y el porcentaje de infección a nivel de individuo y a nivel de campo (Anexo 2). Luego de trasladar las muestras al laboratorio, cada hoja infectada fue lavada con agua destilada, secada con papel toalla y colocada con el envés hacia arriba sobre la tapa de una caja Petri invertida conteniendo agar agua 1,5% en la base por 24 horas, formando una cámara húmeda, para inducir la esporulación.

Para obtener un cultivo puro del patógeno, de cada hoja infectada se realizaron tres cortes de 1 cm^2 desde el margen de la lesión, conteniendo tejido sano y tejido infectado. Para eliminar organismos contaminantes en la superficie de la hoja, a cada corte se lo sumergió en una solución de cloro al 0,5% durante 15 segundos, luego se lavó dos veces en agua destilada estéril, se secó con una toalla de papel estéril (Agrios, 2005) y finalmente, se lo colocó en una placa Petri conteniendo medio selectivo agar centeno A (Anexo 3). Se cortó un cuadrado de agar y se colocó la muestra en la base de la caja para finalmente cubrirla con el agar retirado, trabajando bajo una cámara de flujo laminar (Caten y Jinks, 1968). Las cajas fueron incubadas a 20 °C en la oscuridad hasta observar crecimiento del patógeno. Se realizaron una o más transferencias del patógeno a nuevas cajas con el mismo medio de cultivo hasta la obtención de un cultivo puro. Las cajas se mantuvieron a 20 °C en la oscuridad.

4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y TASA DE CRECIMIENTO

4.2.1. CARACTERES MACROSCÓPICOS

Se evaluaron caracteres morfológicos macroscópicos de 26 cultivos puros de *P. andina* que representaron al menos una muestra por localidad, en cuatro diferentes medios de cultivo: agar V8 10% (Miller, 1955), agar centeno A (Caten y Jinks, 1968), agar tomate de árbol (TTA, por sus siglas en inglés) (Mideros et al., 2018) y agar papa-dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (DIFCO) (Anexo 3). Un disco de 4 mm de diámetro extraído del borde de un cultivo puro de 15 días de crecimiento en medio TTA se colocó en el centro de cada placa Petri (90 mm de diámetro) con los cuatro medios de cultivo por separado, y se incubó durante 15 días a 20 °C en oscuridad. Pasado este tiempo, se evaluó la morfología de la colonia acorde a los métodos descritos por Mounde et al. (2012) y Mideros et al. (2018). Los caracteres de la colonia que se registraron fueron: superficie o patrón, elevación, color, opacidad, forma, margen y diámetro final de la colonia en milímetros (Mounde et al., 2012; Mideros et al., 2018).

4.2.2. CARACTERES MICROSCÓPICOS

Los caracteres morfológicos microscópicos de los aislamientos se evaluaron en los cultivos de 15 días en TTA. Para determinar la morfología de los esporangios se cortó un disco de 4mm de diámetro del borde de un cultivo de 15 días de crecimiento, utilizando el borde de una pipeta Pasteur de vidrio. El disco se transfirió a una placa Petri estéril vacía. Se inundó la placa con agua destilada estéril, sin llegar a cubrir la superficie del disco, y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se observó los discos bajo un microscopio compuesto a 40x de magnificación. Se midió largo del pedicelo, largo de la papila, y largo y ancho en micras, de 40 esporangios maduros al azar de cada aislamiento (Martin, Abad, Balci, e Ivors, 2012) utilizando el software Infinity Analyze (Corporación Lumenera). Se registró, también, la forma del esporangio, su relación largo/ancho y caducidad, e inserción y ramificación de los esporangióforos. Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los tamaños de los esporangios según la localidad de origen del aislamiento, se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Nemenyi, ya que los datos no mostraron una distribución normal. Este análisis se lo realizó utilizando el software R (R Core Team).

Se observó la estructura de las hifas de los aislamientos, para lo cual se tomó con una aguja micelio del margen de un cultivo de 15 días de crecimiento, y se lo colocó inmediatamente en un portaobjetos con una gota de agua destilada, se cubrió con un cubreobjetos y se observó bajo un microscopio compuesto (40x). Se tomaron 20 medidas del ancho de las hifas primarias de cada cultivo, y se registró la presencia o ausencia de engrosamientos hifales (Mideros et al., 2018).

4.2.3. TASA DE CRECIMIENTO

La tasa de crecimiento de *P. andina* se evaluó para 26 aislamientos que representaron al menos una muestra por localidad, en los cuatro medios de cultivo mencionados previamente: agar V8 10%, agar centeno A, TTA y PDA, con el fin de comparar los resultados obtenidos con la literatura existente.

Se extrajo un disco de 4mm de micelio del borde de un cultivo de 15 días de *P. andina* y se lo colocó en el centro de una placa Petri de cada medio. Se incubó a 20 °C en la oscuridad y se midió con un calibrador, el diámetro de la colonia en milímetros cada tres, seis, nueve, 12 y 15 días después de la inoculación (Gabiatti et al., 2006). Para colonias con crecimiento irregular, se calculó el promedio entre el diámetro más largo y el más corto de la colonia (Reeslev y Kjoller, 1995). La tasa de crecimiento para cada medio se calculó usando la ecuación $r(t) = a + v_{cr} \cdot t$, como describen Gabiatti et al. (2006), donde r es el radio de la colonia en milímetros, a es la constante para la regresión linear, v_{cr} es la tasa de crecimiento radial en mm y t es el tiempo de cultivo en horas. Las regresiones lineales se realizaron para visualizar gráficamente el crecimiento de las colonias en el tiempo en los cuatro diferentes medios de cultivo, y determinar la relación entre ambas variables. Se hicieron dos réplicas del ensayo en el tiempo por cada combinación de aislamiento y medio de cultivo. Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk que demostró la no normalidad de los datos, por lo que estos se analizaron mediante pruebas no paramétricas: Scheirer Ray Hare y Mann-Whitney, para evaluar la existencia de diferencias significativas entre las tasas de crecimiento y si éstas se debieron al medio de cultivo utilizado, a la localidad de origen del aislamiento, o a la interacción de ambas variables. Este análisis se lo realizó utilizando el software R (R Core Team).

4.3. ANÁLISIS DE TIPO DE APAREAMIENTO

Se evaluó la producción de estructuras sexuales (oósporas) de *P. andina*, de uno a cuatro aislamientos por localidad. El tipo de apareamiento se determinó al colocar un disco de 4mm de agar de un aislado de *P. andina* de tipo de apareamiento desconocido, junto con un disco de agar de un aislamiento conocido, sea este del tipo de apareamiento A1 (*P. infestans* EC3529) o del tipo de apareamiento A2 (*P. andina* EC3190) separados por 6,5 cm en los extremos de una placa Petri con medio centeno B (Danies, Small, Myers, Childers, y Fry, 2013) (Anexo 3) (Anexo 4). Se sembró una caja de cada aislamiento con el control A1 y otra caja con el control A2. Se realizaron dos repeticiones por cada aislamiento por cada tipo de apareamiento. Las muestras control utilizadas fueron obtenidas del banco de germoplasma de *Phytophthora* del Centro Internacional de la Papa, Sede Quito. Las placas Petri fueron incubadas en la oscuridad a 19 °C por 30 días, pasado este tiempo se observó las placas bajo un microscopio compuesto a 5x de magnificación y se evaluó la presencia o ausencia, y la densidad de oósporas en la zona de confluencia de crecimiento de ambos aislamientos (Mideros et al., 2018). Los aislados que formaron oósporas en combinación con el tipo de apareamiento conocido A1 fueron designados como A2, y aquellos que formaron oósporas en combinación con el tipo de apareamiento conocido A2 se designaron como A1 (Danies et al., 2013). El número de oósporas producidas se determinó cortando con un bisturí, una muestra de 1cm^2 del centro de la zona de confluencia de ambos aislamientos, y observándola sobre un portaobjetos bajo un microscopio compuesto a 10x de magnificación. Se describió la morfología de los gametangios y se tomaron medidas en micras del diámetro de oogonios y oósporas, y largo de los anteridios (Mideros et al., 2018).

5. RESULTADOS

5.1. COLECCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL PATÓGENO

Se colectaron en total 432 hojas de tomate de árbol con síntomas de tizón tardío (Figura 1), de un total de 64 localidades en cinco provincias del Ecuador. De estas, se logró obtener 152 aislamientos puros del patógeno (Figura 2) de 20 localidades diferentes (Tabla 1) (Anexo 5), lo que corresponde al 35% de éxito en el proceso de aislamiento.



Figura 1. Hoja de *Solanum betaceum* con síntomas de tizón. Lesión necrótica en el envés de la hoja, con halos esporulantes blanquecinos.

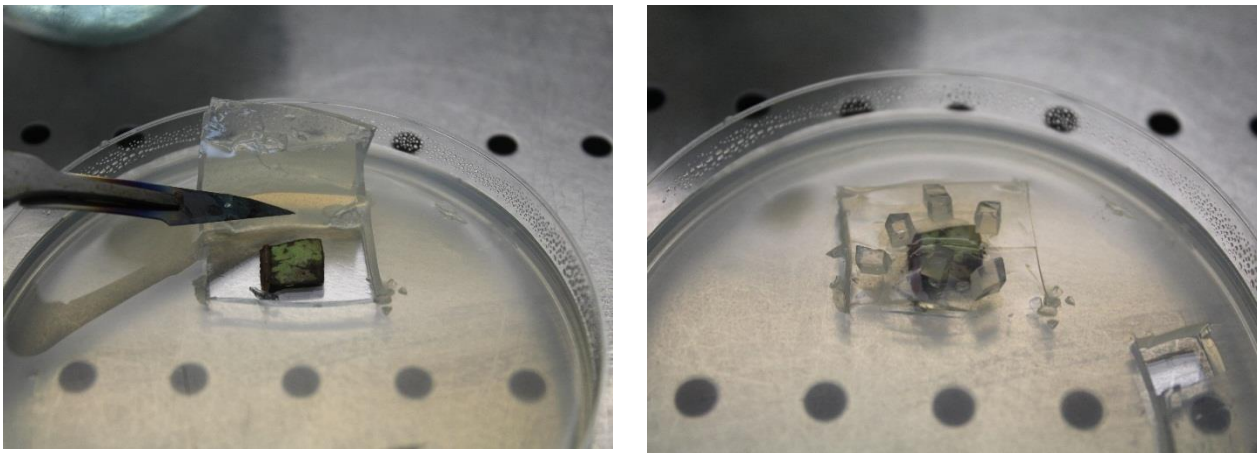


Figura 2. Proceso de aislamiento para la obtención de cultivos puros de *P. andina* a partir de hojas infectadas de *S. betaceum*.

Tabla 1. Número de aislamientos puros de *Phytophthora andina* obtenidos por localidad por provincia

Provincia	Localidad	No. Aislados puros
Pichincha	Nanegalito	17
Pichincha	Canchacoto	12
Pichincha	Tandapi	7
Pichincha	Vía Illolán	7
Pichincha	Illolán	4
Pichincha	Guayllabamba	1
Imbabura	San Isidro	7
Imbabura	Zuleta	3
Tungurahua	Izamba	18
Tungurahua	San Francisco	12
Tungurahua	Píllaro	7
Tungurahua	Runtún campo 1	2
Tungurahua	Runtún campo 2	5
Tungurahua	Runtún campo 4	2
Tungurahua	Runtún campo 5	2
Azuay	Tomebamba	22
Azuay	Don Julo	12
Azuay	Bulán	1
Napo	Baeza campo 1	1
Napo	Baeza campo 2	10

5.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y TASA DE CRECIMIENTO

5.2.1. CARACTERES MACROSCÓPICOS Y MICROSCÓPICOS

Los 26 aislamientos caracterizados presentaron diferente morfología y tamaño final de la colonia dependiendo del medio de cultivo, de la localidad y de la repetición (Anexo 6). En términos generales, a los 15 días de crecimiento en agar V8 produjeron colonias con superficies lisas o algodonosas, pocos con patrones radiados evidentes, de elevación plana o poco elevada de forma desigual sea en el centro o en los bordes, con micelio blanco de opacidad variada, de forma irregular o circular y con margen filiforme. En agar centeno A, las colonias presentaron superficie variable entre lisa o algodonosa, elevación plana o elevada en el centro o en los bordes, algunos con ciertas zonas algodonosas elevadas, micelio blanco de opacidad variada, de forma irregular o circular y con margen filiforme. En TTA, pocos presentaron margen liso, la mayoría presentó un crecimiento muy algodonoso y denso, o intermedio entre liso y algodonoso, algunos con patrones radiados, de elevación variable entre plana o elevada, algunos con colonias algodonosas elevadas, micelio blanco opaco, forma circular o irregular y margen filiforme. En PDA, todos presentaron un crecimiento algodonoso y denso en el centro y liso hacia los bordes, de elevación umbonada, micelio blanco opaco, forma irregular y margen filiforme (Figura 3). Algunos aislamientos presentaron diferencias en su morfología entre repeticiones, en centeno A, TTA o agar V8. No se observó ninguna diferencia morfológica macroscópica entre aislamientos y entre repeticiones en medio de cultivo PDA.

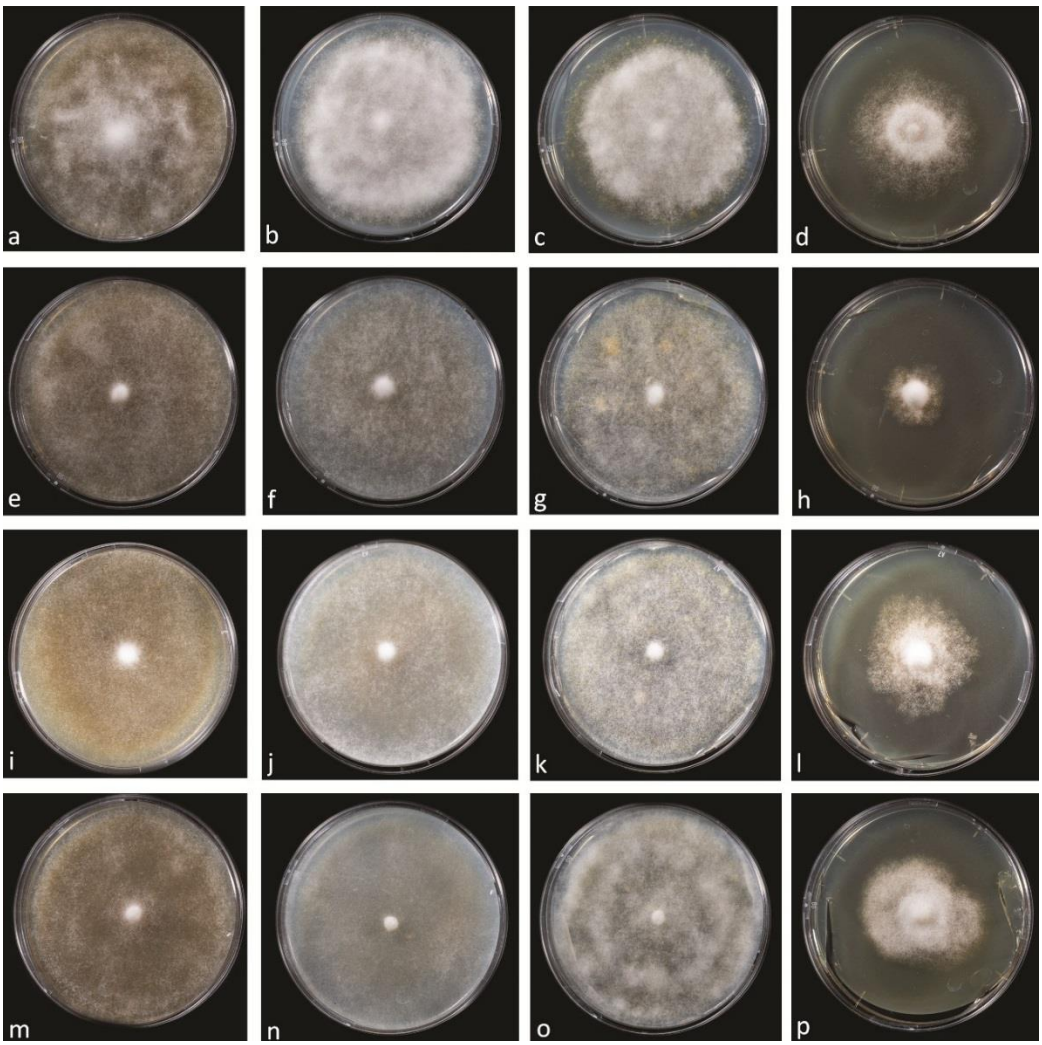


Figura 3. Morfología de las colonias de *Phytophthora andina* después de 15 días de incubación en cuatro medios de cultivo. a-d. aislamiento 7628 de la localidad Baeza Campo 1, e-h. 7491 de Guayllabamba, i-l. 7510 de Zuleta, m-p. 7540 de Tomebamba; en medios de cultivo, de izquierda a derecha, agar V8 10%, agar centeno A, agar tomate de árbol (TTA) y agar papa dextrosa (PDA). **Fotografías:** Ignacio Pacheco.

Las hifas primarias variaron entre 5 – 6,93 µm de ancho con un promedio de 6,15 ± 0,43 µm. Se observó la presencia de hinchamientos hifales únicamente en dos aislamientos (Tabla 2). Los esporangióforos estuvieron dispuestos en simpodios compuestos. Los esporangios fueron caducos, semipapilados con papilas de 0,37 – 2,62 µm de largo (promedio 1,65 ± 0,5µm) y con pedicelos cortos de 1,88 – 2,85 µm de largo (promedio 2,23 ± 0,3 µm). Los esporangios de todos los aislamientos fueron de forma variable entre limoniformes, obovoides, ovoides, elipsoides elongados, irregulares o distorsionados, de largo 28 – 41,36 µm (promedio 36,17 ± 3,7 µm) y ancho 14,53 – 23,06 µm (promedio 17,73 ± 1,9 µm). La relación largo/ancho promedio de los esporangios fue de 2,05 ± 0,18. No se

observó la presencia de clamidosporas (Figura 4). Las pruebas no paramétricas mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los tamaños de esporangios según la localidad de origen de la muestra (Tabla 3). Se encontraron diferencias significativas en cuanto al tamaño de los esporangios siendo los correspondientes a las localidades Baeza campo 1 y Runtún campo 1 los más distintos en cuanto a largo y ancho, mientras que Don Julo, Tomebamba e Izamba fueron los más diferentes para la relación largo/ancho del esporangio.

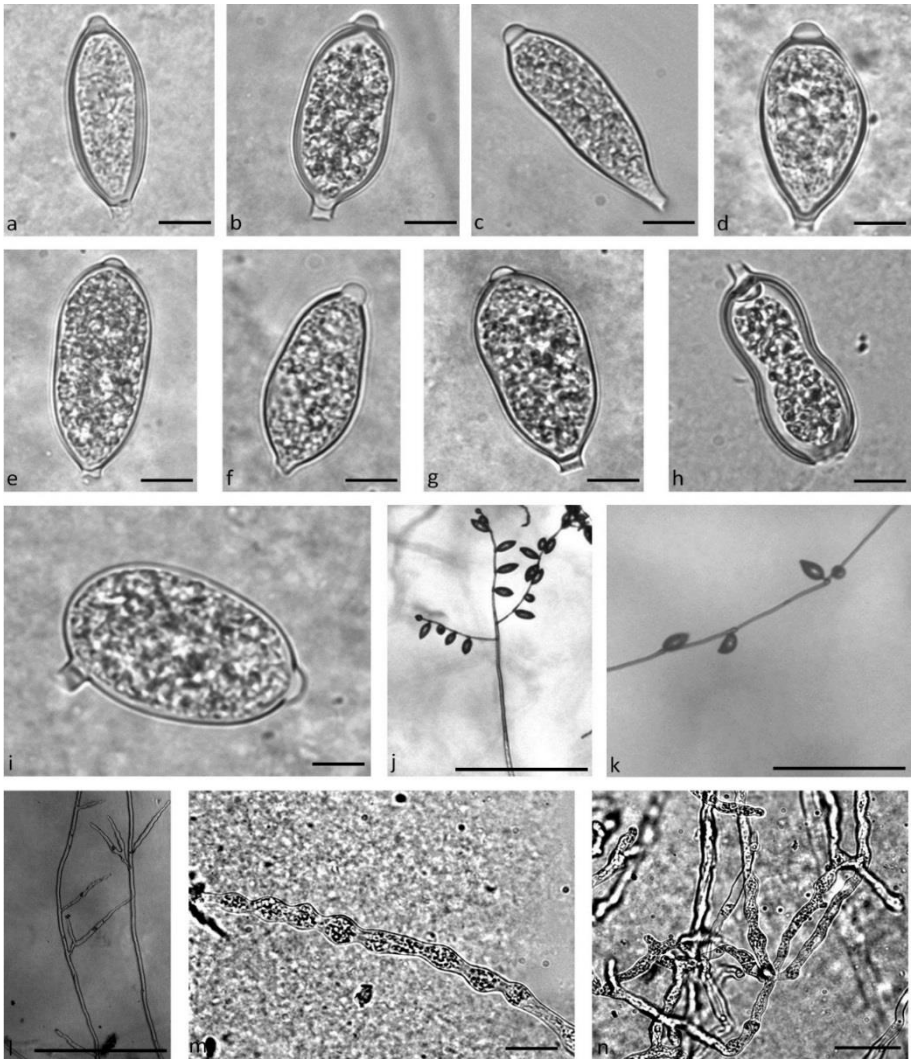


Figura 4. Morfología microscópica de *Phytophthora andina*. a-i. morfología de los esporangios. a-b. forma elongado elipsoide. c. distorsionado o irregular. d. limoniforme. e. obovoide. f-h. distorsionados o irregulares. i. elipsoide con pedicelo lateral. Escala 10 µm. j. esporangióforos dispuestos en simpodios compuestos. k. hinchazones en la base de los esporangios. l. características de las hifas primarias. Escala 100 µm. m. hinchamientos hifales aislamiento 7638 escala 10 µm. n. hinchamientos hifales aislamiento 7628 escala 50 µm.

Tabla 2. Descripción microscópica de veintiséis aislamientos puros de *Phytophthora andina* en medio tomate de árbol

QCAM	PA	C	PE	ESP	HP	CL	HF	OOG	AN	OOS
7491	2,51	+	1,4	CS	6,39	NO	NO	29,64	17,74	21,04
7496	2,01	+	1,93	CS	6,3	NO	NO	26,76	17,81	20,5
7502	2,02	+	1,78	CS	6,29	NO	NO	25,51	23,2	19,47
7510	1,99	+	2,37	CS	6,1	NO	NO	NO	NO	NO
7512	2,59	+	1,64	CS	5	NO	NO	27,9	22,5	20,8
7513	3,01	+	2,62	CS	5,65	NO	NO	NO	NO	NO
7515	2,28	+	1,53	CS	5,90	NO	NO	31,37	18,53	20,8
7518	2,43	+	1,44	CS	6,93	NO	NO	NO	NO	NO
7519	2,45	+	1,43	CS	6,3	NO	NO	29,4	23,64	22,34
7522	2,55	+	1,33	CS	6,44	NO	NO	NO	NO	NO
7533	2,67	+	1,95	CS	5,12	NO	NO	27,42	21,37	23,15
7535	2,14	+	1,07	CS	6,69	NO	NO	28,32	23,13	20,66
7540	2,06	+	1,46	CS	6,11	NO	NO	28,36	25	22,71
7553	1,98	+	1,93	CS	6,42	NO	NO	29,5	22,36	25,1
7566	2,20	+	0,37	CS	6,29	NO	NO	30,65	26,39	21,05
7577	1,99	+	2,01	CS	5,91	NO	NO	29,16	20,82	21,53
7585	1,88	+	1,76	CS	6,09	NO	NO	29,53	19,21	20,75
7587	2,13	+	2,24	CS	6,06	NO	NO	27,45	23	20,94
7594	2,07	+	1,87	CS	6,36	NO	NO	27,64	17,68	21,76
7603	1,89	+	1,56	CS	5,93	NO	NO	28,10	24,5	21,4

Tabla 2. Descripción microscópica de veintiséis aislamientos puros de *Phytophthora andina* en medio tomate de árbol (Continuación…)

QCAM	PA	C	PE	ESP	HP	CL	HF	OOG	AN	OOS
7605	1,98	+	2,24	CSL	5,97	NO	NO	NO	NO	NO
7610	2	+	2,19	CSL	6,19	NO	NO	NO	NO	NO
7623	1,96	+	1,12	CS	5,85	NO	NO	32,2	22,4	24,6
7628	2,85	+	1,83	CS	6,71	NO	SI	NO	NO	NO
7638	2,45	+	0,98	CS	6,73	NO	SI	30,34	22,2	24
7643	2	+	1,37	CS	6,3	NO	NO	33,1	22,12	23,83

+, caducos; AN, largo promedio de los anteridios en µm; C, caducidad; CL, clamidosporas; CS, compuesto simpodial; CSL, compuesto simpodial con ramificaciones alargadas; ESP, esporangióforos; HF, hinchamientos hifales; HP, diámetro promedio de la hifa primaria en µm; OOG, diámetro promedio de los oogonios en µm; OOS, diámetro promedio de las oósporas en µm; PA, largo de la papila en µm; PE, largo del pedicelo en µm; QCAM, Quito Católica Micología.

Tabla 3. Resultado de la prueba de Kruskal-Wallis para el tamaño de los esporangios de *P. andina*

	KW (X^2)	DF	P-valor
Largo ~ localidad	181.41	19	< 2.2e-16
Ancho ~ localidad	269.09	19	< 2.2e-16
Relación ~ localidad	300.52	19	< 2.2e-16

Se observan valores P < 0,05, estadísticamente significativos para las tres variables: largo, ancho y relación largo/ancho de los esporangios dependiendo de su localidad de origen.

5.2.2. TASA DE CRECIMIENTO

La prueba de Scheirer Ray Hare demostró que únicamente la variable medio de cultivo influyó significativamente (P < 0,05) en la tasa de crecimiento de *P. andina* (Tabla 4). La prueba de Mann-Whitney arrojó que los cuatro medios utilizados fueron significativamente diferentes entre sí (Figura 5).

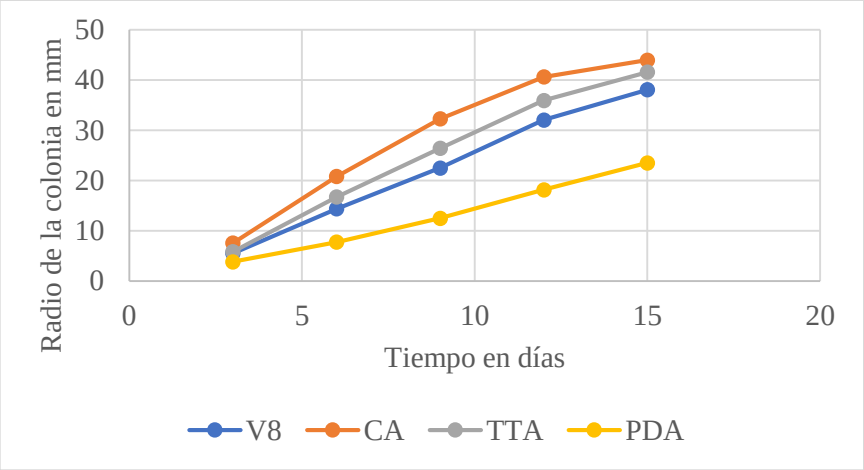


Figura 5. Crecimiento de *P. andina* a 21 °C en cuatro diferentes medios de cultivo. Se observan las medidas promedio del radio en milímetros, tomadas cada 3, 6, 9, 12 y 15 días después de la inoculación en cuatro medios diferentes de crecimiento: V8, agar V8 10%; CA, agar centeno A; TTA, agar tomate de árbol; PDA, agar papa-dextrosa.

Tabla 4. Resultado de la prueba de Scheirer Ray Hare para tasas de crecimiento de *P. andina* según el medio de cultivo, localidad de origen e interacción medio de cultivo-localidad

	DF	Sum Sq	H	P-valor
Medio de cultivo	3	210645	98,158	0,00000
Localidad	19	52241	24,344	0,18329
Medio de cultivo: Localidad	57	58199	27,120	0,99973
Residuos	80	20124		

Se observan valores P < 0,05, estadísticamente significativos solo para la variable medio de cultivo. La localidad de origen de los aislamientos y la interacción de ambos factores no influyeron sobre la tasa de crecimiento de *P. andina*.

El radio promedio de crecimiento de *P. andina* en TTA fue de 2,92 mm/día. Los datos para los medios de cultivo restantes, PDA, V8 y centeno A, no presentaron una distribución normal por lo que no se pudo determinar su tasa de crecimiento mediante regresiones lineales. La regresión lineal para TTA mostró una relación positiva entre el crecimiento en milímetros y el tiempo de incubación, con un coeficiente de correlación de 0,9453 (Figura 6).

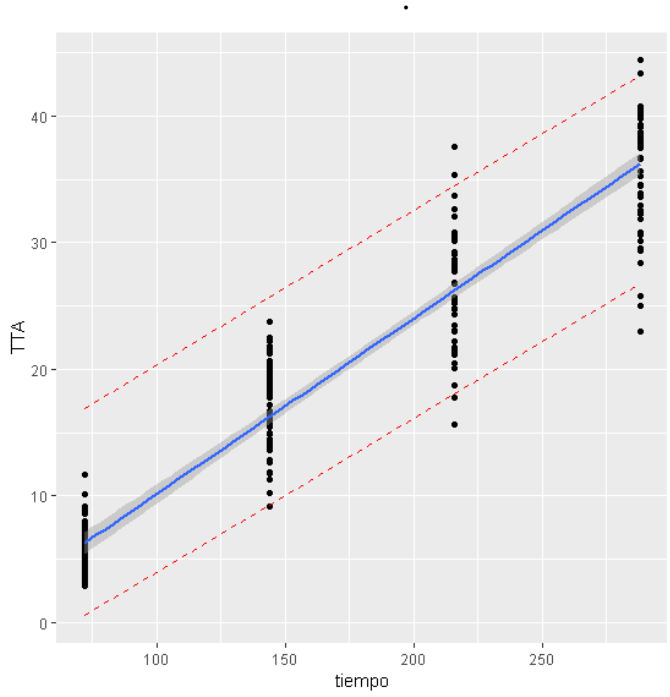


Figura 6. Gráfico de regresión lineal para el medio de cultivo TTA usando intervalos de confianza e intervalos de predicción al 95%. Se observa la línea de ajuste del modelo en azul, los intervalos de confianza en la banda gris y los intervalos de predicción con líneas entrecortadas color rojo. El eje X: tiempo en horas, eje Y: radio de la colonia en milímetros.

5.3. ANÁLISIS DE TIPO DE APAREAMIENTO

Se evaluó la producción de estructuras sexuales (oósporas) en un total de 65 aislamientos puros de *P. andina*. Cincuenta aislamientos produjeron oósporas en agar centeno B, en cruce con el aislamiento de *P. andina* EC3190 de tipo de apareamiento A2, por lo que fueron designados como A1. Los 15 aislamientos restantes no produjeron oósporas al final del experimento con ninguno de los tipos A1 o A2, por lo que se clasificaron como tipo de apareamiento no determinado.

Los oogonios nacieron terminalmente de extremos hifales, no fueron ornamentados, midieron entre 25,5 – 33,1 µm de diámetro (promedio 29,07 ± 1,85 µm). Fueron de forma globosa, de pared delgada, color dorado a café al madurar. Los anteridios fueron anfígenos, en su mayoría largos y cilíndricos, y algunos cortos o globosos; de largo entre 17,6 – 26,4 µm (promedio 21,8 ± 2,5 µm). Las oósporas fueron pleróticas, de diámetro entre 19,5 – 25,1 µm (promedio 21,9 ± 1,52 µm), con pared externa gruesa amarillenta o café (Figura 7). La densidad de oósporas en la zona de confluencia de los aislamientos fue de una a 46 por cm^2, con un promedio de 8,43 ± 7,7 oósporas.

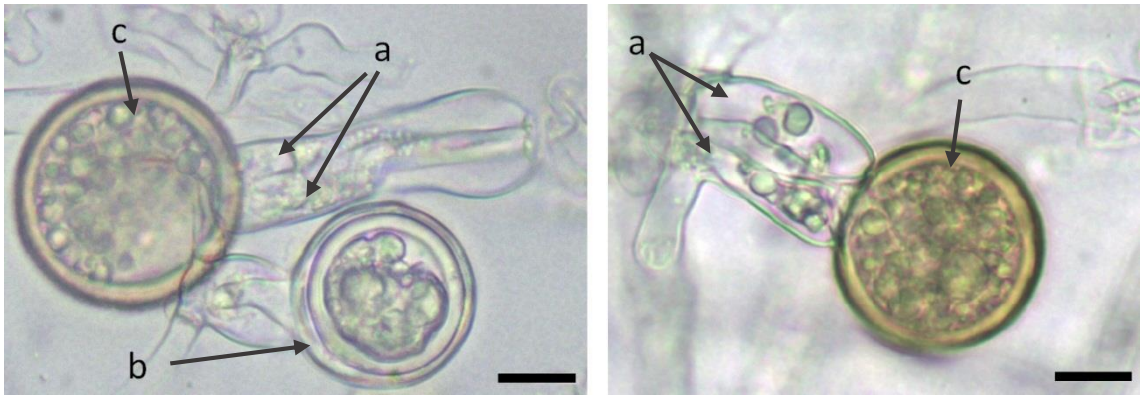


Figura 7. Morfología de gametangios y oósporas de cruces entre muestras de *P. andina* y *P. andina* EC3190 de tipo de apareamiento A2. a. anteridios anfígenos. b. oogonio semi-maduro. c. oósporas pleróticas. Escala = 10 µm.

6. DISCUSIÓN

6.1. COLECCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL PATÓGENO

Phytophthora andina fue exitosamente aislada a partir de muestras de hojas de tomate de árbol con síntomas de tizón. Se consiguió aislamientos que representaron todas las provincias muestreadas a lo largo de las zonas tomateras del Ecuador, por lo tanto, se contó con una buena representación de la población del patógeno en el país.

6.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA

Los aislamientos de *P. andina* analizados en este estudio coincidieron en su mayoría con la descripción morfológica de la especie dada por Oliva et al. (2010), en cuanto al diámetro de la hifa primaria, la disposición de los esporangióforos como simpodios compuestos con ensanchamientos en la base de los esporangios, a la variabilidad en la forma de los esporangios y tipo de papila, al ancho promedio de los esporangios, diámetro de las oósporas, y largo promedio de los anteridios. Sin embargo, algunas características resultaron no coincidir con las descripciones previas de *P. andina* o *P. betacei*, como la presencia de hinchamientos hifales, la relación largo/ancho de los esporangios y la densidad de producción de oósporas.

La morfología de la colonia en agar centeno A y V8 10% varió considerablemente entre aislamientos pertenecientes a diferentes zonas geográficas y dentro de las repeticiones de un mismo aislamiento. En V8 se ha reportado crecimiento denso y algodonoso (Ristaino, 2012), mientras que los aislamientos estudiados varían entre totalmente lisos, pasando por una combinación de liso y algodonoso dentro del mismo cultivo, a densamente algodonosos dependiendo de la localidad de origen de los aislamientos. Las localidades con mayor variación morfológica fueron Nanegalito, Bulán, Don Julo, Baeza, Tomebamba y Píllaro. La rapidez de extensión de la ramificación de las hifas ha sido reportado como un factor que influye en la variación de patrón de las colonias (Appiah, Flood, Bridge y Archer, 2003), y pudo ser un factor en este estudio. Oliva et al. (2010) no proporciona una descripción morfológica de las colonias en agar centeno A. En las muestras estudiadas se observó que, al igual que en agar V8, hubo alta variabilidad en cuanto a patrón y elevación de la colonia

en TTA y centeno A, dependiendo de la localidad de origen. Sin embargo, se evidenció una mayor variabilidad dependiendo del medio de cultivo en que crecieron los aislamientos. Esta variabilidad pudo deberse a la composición química del medio de cultivo. Medios como TTA, que incluyen extracto de levaduras en su composición, actúan como una excelente fuente de aminoácidos, vitaminas y coenzimas, que son factores de crecimiento que aumentan la rapidez y ramificación hifal del micelio lo que resulta en diferentes patrones de la colonia (Appiah et al., 2003; Pradeep, Shakila Begam, Palaniswamy y Pradeep, 2013). Si bien la caracterización de la morfología de la colonia es importante para la descripción de especies de *Phytophthora*, no se considera como un factor determinante en la taxonomía puesto que varía notablemente según el medio de cultivo (Erwin y Ribeiro, 1996).

Los esporangios de las muestras estudiadas correspondieron, en cuanto al ancho, con la descripción de *P. andina*, pero su largo promedio fue de 36,17 μm, notoriamente inferior al descrito, de 44,6 μm (Oliva et al., 2010). Estos valores influyeron en el cálculo de la relación largo/ancho de los esporangios, lo que resultó en un valor mucho menor (2,05) que los reportados anteriormente para *P. andina* (2,4 – 2,7) y también para *P. betacei* (2,6) (Mideros et al., 2018). Cabe indicar que hubo diferencias significativas entre el tamaño de los esporangios analizados en este estudio (Tabla 3). La variabilidad observada en las lecturas tomadas, se puede atribuir a la propia naturaleza variable del patógeno, fenómeno común dentro del género *Phytophthora* (Erwin y Ribeiro, 1996; Fodor et al., 2015).

Para fines comparativos con *P. betacei*, se analizó la morfología microscópica de los aislamientos únicamente en medio TTA, pero estudios han demostrado que pueden existir diferencias en el tamaño y forma de los esporangios, y en su caducidad y tamaño de los pedicelos dependiendo del medio de cultivo utilizado. Se recomienda, entonces, analizar estos caracteres morfológicos en los otros tres medios de cultivo (centeno A, agar V8 y PDA) para tener una información más completa de los caracteres morfológicos de la población de *P. andina* (Al-Hedaithy y Tsao, 2016; Mideros et al., 2018).

Morfológicamente, *P. andina* es similar a la nueva especie recientemente descrita en Colombia, *P. betacei*, en cuanto a su tasa de crecimiento en TTA y el diámetro de los oogonios, pero se diferencia de esta en otros aspectos como la disposición de los esporangióforos, diámetro de las oósporas y largo de los anteridios. El grosor de la papila, la relación largo/ancho de los esporangios y el ancho de la hifa primaria son los caracteres

más robustos para la diferenciación entre especies de *Phytophthora* (Martin et al., 2012; Mideros et al., 2018). Las muestras estudiadas fueron todas semipapiladas (< 3,5 μm), con una relación largo ancho de los esporangios de 2,05 y el ancho promedio de las hifas primarias de 6,15 μm; mientras que el 75% de esporangios de *P. betacei* reportados por Mideros et al. (2018) fueron papilados (≥ 3,5 μm), con una relación largo ancho mayor, de 2,6, y el ancho de sus hifas primarias menor, con un promedio de 2,8 μm. La forma de los esporangios reportado para *P. betacei* es elongada elipsoide o limoniforme, formas que estuvieron presentes en las muestras analizadas en este estudio, aun así, los aislamientos de *P. andina* también presentaron otro tipo de formas muy variables, en concordancia con la descripción de Oliva et al. (2010). Se ha reportado para otras especies de *Phytophthora* que la forma y tamaño de los esporangios puede variar dentro una misma especie, población o muestra (Fodor et al., 2015).

En este estudio se reporta por primera vez la presencia de hinchamientos hifales para *P. andina.* Al contrario de las clamidosporas, los hinchamientos hifales son abultamientos en las hifas que no están delimitados por septos y presentan paredes delgadas, sin embargo, no cumplen una función de supervivencia. Los hinchamientos hifales son un carácter robusto en la identificación de complejos específicos de especies del género *Phytophthora* (Martin et al., 2012), pero en el caso de *P. andina* es considerado útil, no determinante, mientras que *P. betacei* no presenta hinchamientos hifales. Esta característica se registró únicamente en las localidades de Baeza campo 1 y Baeza campo 2, lo que sugeriría que existe una relación con la localidad de origen de los aislamientos. No se conoce la función que cumplen los hinchamientos hifales en especies de *Phytophthora.*

Las diferencias morfológicas encontradas entre la descripción de *P. andina* de Oliva et al. (2010) y este estudio pueden ser resultado de que en el primer estudio se evaluaron muestras provenientes de varios hospederos, no solo tomate de árbol sino también de otras especies silvestres (*S. hispidum*, *Solanum* sp., Anarrhichomenum) y cultivadas de *Solanum* (*S. quitoense, S. muricatum*). Los autores no especifican la morfología encontrada en cada hospedero. Otros investigadores han encontrado variabilidad morfológica en especies del género *Phytophthora* dependiendo del hospedero (Eggers, Balci y MacDonald, 2012). Se sugiere analizar la población del patógeno no solo en tomate de árbol, sino en otros hospederos, para determinar si este factor genera variabilidad morfológica en la población de *P. andina*.

6.3. TASA DE CRECIMIENTO

El medio de cultivo fue el factor más influyente en la tasa de crecimiento. En base únicamente a las observaciones registradas durante el experimento, el crecimiento más rápido fue en agar centeno A, sin embargo, no se pudo comprobar esta hipótesis debido a la falta de normalidad de los datos.

La tasa de crecimiento promedio de *P. andina* en TTA fue similar a la descrita por Mideros et al. (2018) para *P. betacei*. El crecimiento de *P. betacei* en PDA fue muy limitado, con una tasa promedio de 0,02 ± 0,01 mm/d, mientras que, en este estudio, aunque no se pudo calcular la tasa de crecimiento en este medio, si se registró crecimiento para todas las muestras analizadas. Esta fue una característica que distinguió a *P. betacei* de *P. andina.*

6.4. ANÁLISIS DE TIPO DE APAREAMIENTO

No se encontró ningún aislamiento con tipo de apareamiento A2 entre las muestras evaluadas. Los resultados sugieren que no ha habido cambios en el tipo de apareamiento en la población de *P. andina* en los últimos 10 años en tomate de árbol. Cincuenta muestras se clasificaron como tipo de apareamiento A1, mientras que 15 aislamientos no produjeron oósporas con ninguno de los controles A1 o A2. Los resultados apuntan a que la población de *P. andina* de Ecuador aun es de reproducción asexual al no estar presente el tipo de apareamiento A2, como fue reportado en tomate de árbol en Perú (Forbes et al., 2016), sin embargo, análisis genéticos son necesarios para determinar si existe o no reproducción sexual en la población del patógeno.

En especies heterotálicas de *Phytophthora* como *P. andina*, ambos tipos de apareamiento son capaces de producir oogonios y anteridios, pero tienden a producir uno de los dos gametangios en mayor proporción que el otro (Agrios, 2005), mientras que la formación de oósporas depende de dos procesos: la producción de las hormonas sexuales α^1 y α^2, y la respuesta positiva a dichas hormonas determinada por la presencia de receptores activos (Ko, 2007). Normalmente se espera que el tipo de apareamiento A1 produzca la enzima α^1 y presente receptores para la hormona α^2, y que el tipo de apareamiento A2 produzca la enzima α^2 y presente receptores para la hormona α^1, pero existe una tercera posibilidad, en la cual ninguno de los dos aislamientos en un ensayo de apareamiento

estimula al otro para la formación de oósporas, aunque esta posibilidad es aún hipotética. Existe también evidencia de que aislamientos A2 son capaces de producir ambas hormonas y que la producción de estas depende de las variantes genéticas de la especie (Tomura, Molli, Murata, y Ojika, 2017). Al estar todos los aislamientos expuestos a las mismas condiciones de cultivo, es posible que los 15 aislamientos que fallaron en producir oósporas presenten alguno de estos dos sistemas poco frecuentes, es decir, que sean de tipo de apareamiento A2 y produzcan α^1 o α^2 y su aislamiento control carezca de los receptores para la hormona producida; o que sean variantes genéticas incapaces de producir estas hormonas. Cualquiera de estas dos posibilidades debería probarse a través de ensayos de producción y recepción de hormonas.

Otra posibilidad puede ser que el tiempo en el cual se realizó el experimento no fue suficiente para que esas 15 muestras produjeran oósporas. Sin embargo, los 50 aislamientos de tipo de apareamiento A1 produjeron oósporas entre 21 y 30 días de iniciado el ensayo, lo que se considera un tiempo estándar para la evaluación de la producción de oósporas (Mideros et al., 2018).

El tomate de árbol en Perú es cultivado a pequeña escala y principalmente en jardines caseros, sin fines comerciales. La población A2 registrada por Forbes et al. (2016) en ese país fue obtenida de la provincia de Oxapampa en el departamento de Pasco, ubicada a 1571 km de la frontera norte con Ecuador. Para que un evento de interacción sexual entre ambas poblaciones ocurra, debe existir transferencia del patógeno, ésta pudiera ser mediante exportación de la fruta o movimiento de estructuras de una planta infectada de una región a otra (Forbes et al., 2016). Perú no es un país exportador de tomate de árbol, la baja producción del fruto no resulta rentable para su comercialización fuera del país (Amaya, 2006), por lo que se esperaría baja probabilidad de que un evento de este tipo ocurra. Sin embargo, no se puede descartar que pueda haber movimiento de material infectado entre ambos países.

La morfología de las oósporas y anteridios analizada en este estudio coincidió con la descripción de *P. andina,* sin embargo, el diámetro de los oogonios fue de 25 μm, menor a 37,5 μm descrito por Oliva et al. (2010). Aun así, la morfología y tamaño de los oogonios no ha sido considerado lo suficientemente variable dentro del género como para ser un factor

taxonómico en la caracterización de especies de *Phytophthora* (Kaosiri, Zentmyer y Erwin, 1980).

Aún falta esclarecer aspectos de la etiología de la enfermedad en tomate de árbol, como, por ejemplo, si el inóculo *P. andina* de tomate de árbol puede sobrevivir en hospederos alternativos como en especies silvestres de *Solanum*, o naranjilla donde también se ha encontrado al patógeno (Oliva et al., 2010), o cuánto tiempo puede permanecer viable el inóculo en ausencia del hospedero, o si puede dispersarse por corrientes de agua o viento. Sabemos que *P. andina* puede producir oósporas *in vitro* en presencia del tipo de apareamiento opuesto de *P. infestans*, o de *P. andina* de otros hospederos, como se demostró en este estudio y en el de Forbes et al. (2016) y Oliva et al. (2010), pero no se sabe si esa progenie es capaz de infectar al tomate de árbol o cuán viable es en el tiempo. Al no tener resueltas estas incertidumbres, se debe considerar que existe el potencial para un movimiento y apareamiento del patógeno a lo largo de las zonas tomateras de la región, desde Colombia hasta Perú y otras zonas andinas, por lo que es indispensable monitorear los cambios que se puedan dar en la población del patógeno.

El uso de marcadores fenotípicos, como la morfología y análisis de tipo de apareamiento, es el primer paso para la identificación y caracterización de especies de *Phytophthora*. Sin embargo, estudios a nivel genético son indispensables para detectar cambios en las poblaciones de *P. andina*. Actualmente, análisis moleculares en cuanto a haplotipo mitocondrial, secuenciación de genes nucleares y microsatélites, se están realizando para obtener información completa sobre la población ecuatoriana de *P. andina.* Las diferencias morfológicas encontradas en este estudio, en comparación con la descripción de Oliva et al. (2010), deben ser analizadas más a fondo para encontrar las posibles razones de esta variabilidad. Los efectos de factores como la temperatura, humedad y uso de agroquímicos, sobre la morfología de fitopatógenos como *P. andina*, deben ser evaluados en futuros estudios para que ayuden a una identificación certera del patógeno y poder ofrecer a los agricultores herramientas más eficientes de control de la enfermedad y evitar efectos negativos en el ambiente y salud humana, así como pérdidas económicas importantes.

7. CONCLUSIONES

Marcadores fenotípicos, como la morfología microscópica y el tipo de apareamiento, permitieron la caracterización del patógeno *P. andina*, agente causal del tizón en cultivos de tomate de árbol y jardines caseros del Ecuador.

La población actual de *P. andina* presentó diferencias morfológicas, principalmente microscópicas, en comparación con la población descrita hace 10 años.

No se ha encontrado el tipo de apareamiento A2 en la población de *P. andina* en el Ecuador. Sin embargo, no se puede descartar que eventos de movimiento de material infectado entre Perú y Ecuador puedan ocurrir en el futuro por lo que un monitoreo permanente de la población es necesario.

La población de *P. andina* del Ecuador es diferente macro y microscópicamente de la población de *P. betacei* en Colombia.

El estudio de la morfología macroscópica y microscópica es importante y necesario para todo estudio de caracterización de especies del género *Phytophthora*, pero por si solo no puede llegar a definir especies con exactitud por lo que debe ser complementado con estudios a nivel genético.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta Quezada, P. (2011). Caracterización morfológica y molecular de tomate de árbol, *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae). Universidad Politécnica de Madrid.

Adler, N. E., Erselius, L. J., Chacón, M. G., Flier, W. G., Ordoñez, M. .. .., Kroon, L. P. N. M. y Forbes, G. (2004). Genetic Diversity *of Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador Provides New Insight Into the Origin of This Important Plant Pathogen. *Phytopathology*. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.2.154.

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 5th Edition. Academic Press, New York, USA, ISBN: 0120445654, 952.

Al-Hedaithy, S. A. y Tsao, P. H. (2016). Mycological Society of America The Effects of Culture Media and Sporulation Methods on Caducity and Pedicel Length of Sporangia in Selected Species of *Phytophthora* Published by : *Mycological Society of America Stable* URL. Recuperado de http://www.jstor.org/stable/3759, 71(2), 392-401.

Amaya, R. J. (2006). Tomate de árbol (*Cyphomandra betaceae* Send.) Gerencia Regional de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente. Trujillo. Perú.

Andersson, B. (2007). *Sexual reproduction in Phytophthora infestans - epidemiological consequences* (Tesis doctoral). Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia.1652-6880 2007:77. ISBN 978-91-576-7376-3.

Appiah, A. A., Flood, J., Bridge, P. D. y Archer, S. A. (2003). Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of Phytophthora isolates from cocoa. *Plant Pathology*. doi:10.1046/j.1365-3059.2003.00820.

Calvo, I. (2009). Cultivo de tomate de arbol. Proyecto microcuenca Plantón, Pacayas (Boletín técnico No. 8).

Cárdenas, M., Grajales, A., Sierra, R., Rojas, A., González-Almario, A., Vargas, A., …y Restrepo, S. (2011). Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region. *BMC Genetics*. doi:10.1186/1471-2156-12-23.

Carter, D. A., Archer, S. A., Buck, K. W., Shaw, D. S. y Shattock, R. C. (1990). Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. *Mycological Research*. doi:10.1016/S0953-7562(09)81344-0.

Castaño Monsalve, J., Ramírez Gil, J., Patiño Hoyos, L. y Morales Osorio, J. (2015). Alternativa para el manejo de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en *Solanum betaceum* Cav. mediante inductores de resistencia. *Revista de Protección Vegetal*, *30*(3), 204-212. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522015000300006&lng=es&tlng=es.

Caten, C. E. y Jinks, J. L. (1968). Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. *Cultural variation*. http:// doi:10.1139/b68-055.

Chacón Acosta, M. G. (2007). *Variability of Phytophthora infestans sensu lato in the highland tropics of Ecuador*. (Tesis doctoral). Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, Suiza. https://doi.org/10.3929/ethz-a-005358652.

Danies, G., Small, I. M., Myers, K., Childers, R. y Fry, W. E. (2013). Phenotypic Characterization of Recent Clonal Lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Plant Disease*. doi:10.1094/PDIS-07-12-0682-RE.

Eggers, J. E., Balci, Y. y MacDonald, W. L. (2012). Variation Among *Phytophthora cinnamomi* Isolates from Oak Forest Soils in the Eastern United States. *Plant Disease.* doi:10.1094/PDIS-02-12-0140-RE.

Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua - ESPAC 2016 (2016). Instituto Nacional de Estadística y Censos – INEC. Recuperado de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/

Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua - ESPAC 2017. (2017). Instituto Nacional de Estadística y Censos – INEC. Recuperado de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/

Erwin, D. C. y Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. *The American Phytopathological Society*. doi:10.1016/S0261-2194(97)83220-6.

Fodor, E., Hâruata, O., Milenković, I., Lyubenova, A., Tziros, G., Keča, N., … Kostov, K. (2015). Geometric morphometry of *Phytophthora plurivora* sporangia. *Annals of Forest Research*. doi:10.15287/afr.2015.411.

Forbes, G. (2001). Laboratory manual for *Phytophthora infestans* work at CIP-Quito. CIP. 1-40.

Forbes, G. A., Gamboa, S., Lindqvist-Kreuze, H., Oliva, R. F. y Perez, W. (2016). Identification of an A2 population of *Phythophthora andina* attacking tree tomato in Peru indicates a risk of sexual reproduction in this pathosystem. *Plant Pathology*. doi:10.1111/ppa.12531.

Forbes, G. A., Morales, J. G., Restrepo, S., Perez, S., Gamboa, S., Ruiz, R., … Acuña, I. (2013). *Phytophthora infestans* and *Phytophthora andina* on Solanaceous hosts in South America. *Phytophthora:* a global perspective, (January), 48-58. doi:http://dx.doi.org/10.1079/9781780640938.0048

Gabiatti, C., Vendruscolo, F., Piaia, J., Rodrigues, R., Durrant, L. y Costa, J. (2006). Radial growth rate as a tool for the selection of filamentous fungi for use in bioremediation. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 49*, 29-34.

Gavino, P. D. y Fry, W. (2002). Diversity in and evidence for selection on the mitochondrial genome of *Phytophthora infestans*. *Mycologia*.

doi:10.1080/15572536.2003.11833172.

Griffith, G. W. y Shaw, D. S. (1998). Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (10), 4007-4014.

Kaosiri, T., Zentmyer, G. A. y Erwin, D. C. (1980). Oospore morphology and germination in the *Phytophthora palmivora* complex from Cacao. *Mycologia*, 72 (5), 888-907.

Ko, W. H. (2007). Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora. Botanical Studies*. doi:10.1099/00221287-116-2-459.

Kroon, L. P. N. M., Bakker, F. T., Van Den Bosch, G. B. M., Bonants, P. J. M. y Flier, W. G. (2004). Phylogenetic analysis of *Phytophthora species* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*. doi:10.1016/j.fgb.2004.03.007.

León F, J., Viteri D., P. y Cevallos A., G. (2004). Manual del cultivo de tomate de árbol. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa de Fruticultura. (Manual no. 61).

Martin, F., Abad, Z., Balci, Y. e Ivors, K. (2012). Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease, 96* (8), 1080-1103.

Mideros, M., Castillo, Y., Obando, C., Cárdenas, M., Lagos Mora, L., Bernal, A., Jiménez, P. y Restrepo, S. (2011). Genetic structure and pathogenicity of *Phytophthora infestans* sensu lato collected from *Solanum betaceum* in southwestern Colombia. *Phytopathology* 101, S120.

Mideros, M. F., Turissini, D. A., Guayazán, N., Ibarra-Avila, H., Danies, G., Cárdenas, M., … Restrepo, S. (2018). *Phytophthora betacei*, a new species within *Phytophthora* clade 1c causing late blight on *Solanum betaceum* in Colombia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. doi:10.3767/persoonia.2018.41.03.

Miller, P. (1955). V-8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology*, *45*, 461-462.

Mounde, L., Ateka, E., Kihurani, A. y Wasilwa, L. (2012). Morphological characterization and identification of *Phytophthora* species causing citrus gummosis in Kenya. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, *12* (7), 7075-7076.

Niño Palacio, D. y Cotrino Sarmiento, E. (2015). *Análisis del comportamiento ecofisiológico y la germinación en tomate de árbol Solanum betaceum, material naranja común, en el municipio de Pasca-Cundinamarca*. (Disertación de pregrado). Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá, Colombia.

Oliva, R. F., Kroon, L. P. N. M., Chacón, G., Flier, W. G., Ristaino, J. B. y Forbes, G. A.

(2010). *Phytophthora andina* sp. nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the Andean highlands. *Plant Pathology*. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02287.

Ordóñez, M. E. 2018. Base de datos del Fungario QCAM. Versión 1.0. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en <https://bioweb.bio/portal/> (Fecha de consulta: 2 de noviembre de 2018).

Ordóñez, M. E., Hohl, H. R., Velasco, J. a, Ramon, M. P., Oyarzun, P. J., Smart, C. D., …y Erselius, L. J. (2000). A Novel Population of *Phytophthora*, Similar to *P. infestans*, Attacks Wild *Solanum* Species in Ecuador. *Phytopathology*. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.2.197.

Osorio, G. (2013). *Proyecto De Factibilidad Para La Exportación De Pulpa De Tomate De Árbol a México, Periodo 2012-2026.* Universidad Tecnológica Equinoccial. Recuperado de http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/6817/1/58445_1.pdf.

Páez, O., Valverde, R., Gómez, L. y Brenes, A. (2004). Determinación del tipo de apareamiento con marcadores moleculares en aislamientos de *Phytophthora infestans* recolectados en pantaciones de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, *28* (2), 9-16.

Peters, R. D., Platt, H. W. y Hall, R. (1999). Use of allozyme markers to determine genotypes of *Phytophthora infestans* in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology, 21* (2), 144-153. doi:10.1080/07060669909501205.

Pradeep, F., Shakila Begam, M., Palaniswamy, M. y Pradeep, B. V. (2013). Influence of Culture Media on Growth and Pigment Production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 Isolated from Paddy Field Soil. *World Applied Sciences Journal*. doi:10.5829/idosi.wasj.2013.22.01.7265.

Raffaele, S. y Kamoun, S. (2012). Genome evolution in filamentous plant pathogens: Why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/nrmicro2790.

Ramírez-Gil, J., Gil-Aguirre, A. y Morales-Osorio, J. (2017). Etiology of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) diseases. *Revista de Protección Vegetal, 32* (1), 33-51.

Reeslev, M. y Kjoller, A. (1995). Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. *Applied and Environmental Microbiology, 61* (12), 4236-4239.

Revelo, J., Mora, E. y Reyes, M. (2004a). Comportamiento de genotipos comerciales de Tomate de árbol a las enfermedades nudo de la raíz, antracnosis del fruto, tizón tardío y mancha negra del tronco. Plegable de divulgación No. 228. INIAP, Promsa.

Revelo, J., Mora C., E., Gallegos, P. y Garcés, S. (2008). Enfermedades, nematodos e insectos plaga del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.): Una guía para su identificación en el campo. Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina. Departamento Nacional de Protección Vegetal. (Boletín Técnico no. 115).

Revelo, J., Pérez, E. y Maila, M.V. (2004b). Cultivo ecológico del tomate de árbol en Ecuador: Texto de consulta del estudiante. (Manual no. 65). Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina/Promsa/Fontagro.

Ristaino, J. B. (2012). Identification of Common *Phytophthora* species. *Phytophthora andina* Fact Sheet. Recuperado de: http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2016/Phytophtora_CD_update/key/A Lucid Key to the Common Species of *Phytophthora*/Media/Html/Phytophthora_andina.htm.

Sistema de Información del Agro - Sinagap (2016). Boletín situacional. Tomate de árbol y maracuyá 2015. Recuperado de: http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2016/boletin_situacional_tomate_arbol_maracuya_2015.pdf.

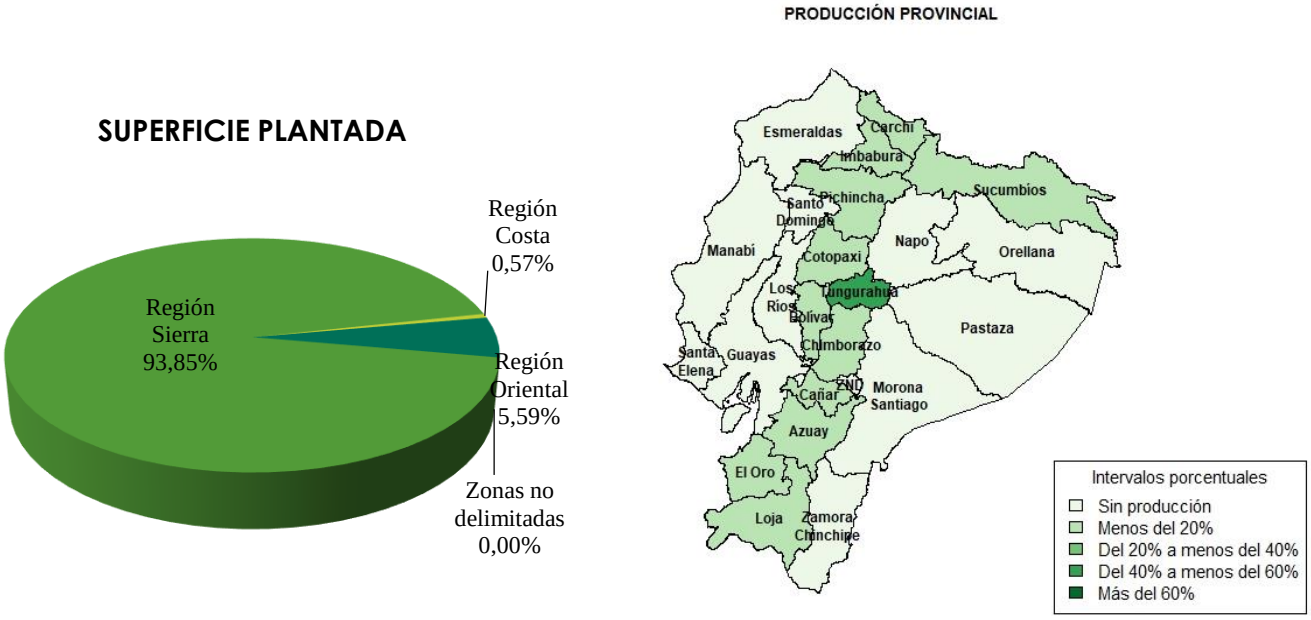
Tomura, T., Molli, S. D., Murata, R. y Ojika, M. (2017). Universality of the *Phytophthora* mating hormones and diversity of their production profile. *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-017-05380-3.

Vargas, A. M., Quesada Ocampo, L. M., Céspedes, M. C., Carreño, N., González, A., Rojas, Al, … Restrepo, S. (2009). Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Colombia: first report of the A2 mating type. *Phytopathology*. doi:10.1094/PHYTO-99-1-0082.

Volk, T. J. (2001). *Phytophthora infestans*, cause of late blight of potato and the Irish potato famine. Recuperado de http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/mar2001.html.

9. ANEXOS

Anexo 1. Porcentaje de superficie plantada, cosechada y producida, de tomate de árbol en Ecuador, según región y provincia (tomado de ESPAC, 2017).



Anexo 2. Formulario de muestreo.

Código de campo:_____ **Fecha de colección:**_____ **No. De foto:**_____

Coordenadas GPS:_____

Provincia:_____ **Cantón:**_____ **Altitud:**_____

Localidad:_____

Descripción del sitio:

_____
_____
_____

Colector/es:_____

Hospedero:_____

Variedad:_____

Estructuras colectadas:_____

Nivel de enfermedad al momento de colección:_____

_____

Manejo del cultivo:

1. **Fecha de siembra:**_____
2. **Dueño:**_____
3. **Manejo:**_____
4. **Riego:**_____

Aplicaciones previas de pesticidas:

1. **Fecha de aplicación:**_____
2. **Protectante o curativo:**_____
3. **Dosis (g/ha):**_____
4. **Desempeño del producto:**_____

Comentarios:_____

_____
_____
_____
_____

Anexo 3. Protocolos de medios de cultivo utilizados

Agar Centeno A (Caten y Jinks, 1968)

Para 1000ml

1. Remojar 60g de centeno en agua destilada durante 24 horas. Cernir el agua y reservarla.
2. Licuar los granos de centeno con agua destilada por 15 segundos.
3. Llevar el grano licuado a baño María a 60 °C durante dos horas o a cocción durante 45 minutos.
4. Filtrar y descartar el sedimento.
5. Combinar el agua de remojo reservada con el filtrado de cocción y añadir 20g de sacarosa y 15g de agar.
6. Aforar a 1lt.
7. Autoclavar a 15psi por 20 minutos.
8. Dejar enfriar hasta 60 °C y añadir 400µl de mix de antibióticos.
9. Agitar hasta disolver los antibióticos y servir.

Antibióticos

Para 10ml de stock en DMSO

Griseofulvina	200mg
Polimixina B	500mg
Rifamicina	300mg
Nistatina	50mg
Benlate (50%WP)	100mg
Ácido nalidíxico	50mg

Preparar un stock en 10ml de DMSO y dividir en alícuotas de 1ml. Mantener en congelación hasta su uso. De cada alícuota de 1ml usar 400µl por litro de medio.

Agar Centeno B (Danies et al., 2013)

Para 1000ml

1. Remojar 60g de centeno en agua destilada durante 36 horas.
2. Cernir y reservar el agua.
3. Hervir los granos de centeno durante 1 hora en suficiente agua destilada para cubrir los granos.
4. Cernir y combinar el agua filtrada con el agua de remojo.
5. Añadir 20g de sacarosa, 15g de agar y 0,05g de β-sitosterol, aforar a 1lt.
6. Autoclavar a 15 psi por 20 minutos.
7. Dejar enfriar y servir en cajas Petri.

Agar V8 10% no clarificado (Miller, 1955)

Para 1000ml

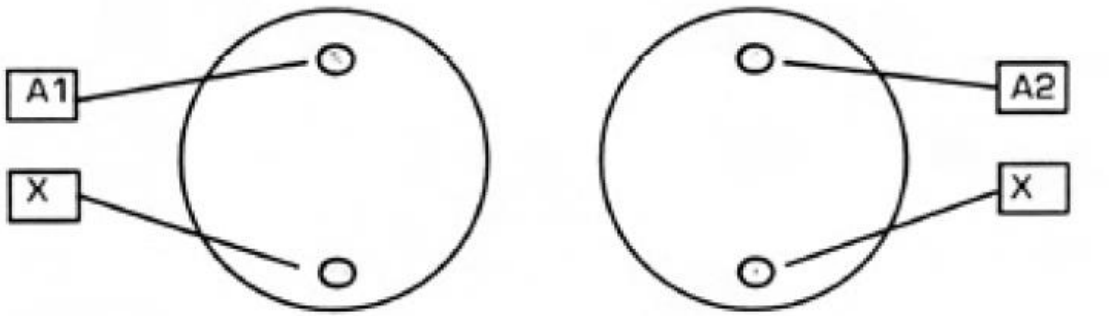
1. Combinar 100ml de jugo V8 con 900ml de agua destilada en una botella BOECO de 1lt.
2. Añadir 1g de CaCO3 y 15g de agar, y mezclar bien.
3. Autoclavar a 15 psi por 20 minutos.
4. Dejar enfriar y agitar mientras se dispensa para evitar la precipitación del CaCO3.

Agar tomate de árbol (TTA) (Mideros et al., 2018)

Para 1000ml

1. Preparar extracto de tomate de árbol licuando 550g de fruta pelada y cortada en 1lt de agua destilada.
2. Combinar 100ml de extracto de tomate de árbol con 900ml de agua destilada y añadir 0,25g de CaCO3, 0,5g de extracto de levadura, 25g de sacarosa y 15 de agar.
3. Autoclavar a 15 psi por 20 minutos.
4. Dejar enfriar y agitar mientras se dispensa para evitar la precipitación del CaCO3.

Anexo 4. Esquema de ensayo de tipo de apareamiento (tomado de Forbes, 2001). A1 y A2 corresponden a las muestras control y X a las muestras con tipo de apareamiento desconocido a evaluar.



Anexo 5. Mapa de ubicación de las localidades muestreadas para *P. andina* en *S. betaceum* (tomado de BioWeb.bio). Localidades se muestran como puntos amarillos.



Anexo 6. Descripción macroscópica de veintiséis aislamientos puros de *P. andina* en cuatro diferentes medios de cultivo: agar V8 10%, agar centeno A, agar tomate de árbol, agar papa-dextrosa

QCAM	V8							Ca							TTA							PDA						
	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T
7491	A	P	B	LO	C	F	89	A	LE EC CA	B	LO	C	F	89	A	LE	B	LO	C	F	89	ADC LB	U	B	O	I	F	29.2
7491*	A HTC	PB EC	B	LO	I	F	82.7	L	P	B	LO	C	F	89	L	P	B	LO	C	F	89	–	–	–	–	–	–	–
7496	LB AC	PC EB	B	LO	C	F	89	LA	P	B	LO	C	F	89	A	LE	B	O	I	F	70	ADC LB	U	B	O	I	F	56
7496*	A	LEB EC	B	T	C	F	89	A ADB	LE EB CA	B	LO	C	F	89	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7502	A	PC EB	B	LO	C	F	89	LA	P	B	LO	C	F	89	A	LE	B	O	C	F	89	ADC CR LB	U	B	O	I	F	57.5
7502*	LC HTC AB	PC EB	B	T	C	F	89	–	–	–	–	–	–	–	L	P	B	O	C	F	89	–	–	–	–	–	–	–
7510	L	P EC	B	LO	C	F	89	L LA	P	B	O	C	F	89	L LA	P	B	LO	C	F	89	ADC LB	U	B	O	I	F	52

Anexo 6. Descripción macroscópica de veintiséis aislamientos puros de *P. andina* en cuatro diferentes medios de cultivo: agar V8 10%, agar centeno A, agar tomate de árbol, agar papa-dextrosa (Continuación…)

QCAM	V8							cA							TTA							PDA						
	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T
7512	LC LAB	PC LEB	B	LO	I	F	81.9	LA	P	B	LO	C	F	89	AC LB	P	B	O	I	F	75.2	ADC LB	U	B	O	I	F	28.9
7513	L	P	B	T	I	F	69.6	LA	P FR	B	LO	C	F	89	AC LB	P	B	O	I	F	76.5	ADC LB	U	B	O	I	F	20.4
7515	L	P FR	B	T	I	F	62.5	LA	P	B	LO	C	F	89	A	P	B	LO	I	F	79.2	ADC LB	U	B	O	I	F	39.1
7515*	–	–	–	–	–	–	–	L	LE	B	LO	I	F	77.6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7518	L	P FR	B	T	I	F	66.9	A	LE	B	O	C	F	89	LA	P	B	LO	I	F	85.7	ADC LB	U	B	O	I	F	30.2
7518*	–	–	–	–	–	–	–	L	P	B	LO	C	F	89	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7519	L	P	B	T	I	F	72.2	A	LE	B	O	I	F	86.1	A	P	B	LO	I	F	87.3	ADC LB	U	B	O	I	F	43.9
7519*	LA	PC EB	B	LO	I	F	79.3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7522	L	P	B	T	I	F	71.8	A	P	B	LO	C	F	89	LA	LE	B	LO	I	F	85.6	ADC LB	U	B	O	I	F	56.2
7533	L HTC	P	B	T	I	F	75.3	LA	P	B	LO	C	F	89	LA	LE FR	B	LO	I	F	83.1	ADC LB	U	B	O	I	F	39.2

Anexo 6. Descripción macroscópica de veintiséis aislamientos puros de *P. andina* en cuatro diferentes medios de cultivo: agar V8 10%, agar centeno A, agar tomate de árbol, agar papa-dextrosa (Continuación…)

QCAM	V8							Ca							TTA							PDA						
	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T
7535	A HTC	E	B	LO	I	F	80.6	AD	E	B	O	C	F	89	AD	E	B	O	I	F	86.6	ADC LB	U	B	O	I	F	54.9
7535*	LB AC	PB EC FR	B	LO	C	F	89	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7540	LC HTC AB	PC EB	B	T	I	F	89	LA	LE	B	O	C	F	89	A R	LEC EB R	B	O	C	F	89	ADC LB	U	B	O	I	F	56
7540*	–	–	–	–	–	–	–	A	E	B	O	C	F	89	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7553	L	P	B	T	I	F	80.2	LA	LE	B	O	C	F	89	A R	LEC EB R	B	LO	I	F	84.2	ADC LB	U	B	O	I	F	60
7553*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	LA	LE	B	LO	I	F	86.1	–	–	–	–	–	–	–
7566	L	PB EC	B	T	I	F	80	LA	LE	B	LO	C	F	89	A	LE	B	O	C	F	89	ADC LB	U	B	O	I	F	54.1
7566*	A HTC LB	PB EC	B	LO	I	F	83.1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Anexo 6. Descripción macroscópica de veintiséis aislamientos puros de *P. andina* en cuatro diferentes medios de cultivo: agar V8 10%, agar centeno A, agar tomate de árbol, agar papa-dextrosa (Continuación…)

QCAM	V8							Ca							TTA							PDA						
	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T
7577	LC AB	PC EB	B	LO	I	F	76.7	LA	P	B	LO	I	F	81.6	AC LB	PB EC	B	O	I	F	77.3	ADC LB	U	B	O	I	F	45.2
7585	L	P	B	T	I	F	61.3	AC LB	PB CAE	B	LO	I	F	85.8	ADC LB	EC PB	B	O	C	F	89	ADC LB	U	B	O	I	F	46.5
7585*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	L ABI	P EBI	B	O	I	F	76.2	–	–	–	–	–	–	–
7587	L HTC	P	B	T	I	F	74.3	LA	P	B	LO	I	F	85.6	AC LB	PB EC	B	O	I	F	77.3	ADC LB	U	B	O	I	F	37.9
7594	L	P	B	T	I	F	59.1	LAB AC	LE	B	LO	I	F	87.3	LA	PB EC	B	O	I	F	86.4	ADC LB	U	B	O	I	F	45.8
7603	L HTC	P	B	T	I	F	59	AC LB	PB EC	B	O	I	F	87.1	ADC LB	PB EC	B	O	I	F	84	ADC LB	U	B	O	I	F	43.2
7603*	L ABI	P EBI	B	LO	I	F	48.4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7605	L AB	P	B	T	I	F	73.3	LA	P	B	LO	C	F	89	L	P	B	LO	C	F	89	ADC LB	U	B	O	I	F	63.3
7610	L	P	B	T	C	F	89	L LA	P	B	LO	C	F	89	L	P	B	LO	C	F	89	ADC LB	U	B	O	I	F	67.9

Anexo 6. Descripción macroscópica de veintiséis aislamientos puros de *P. andina* en cuatro diferentes medios de cultivo: agar V8 10%, agar centeno A, agar tomate de árbol, agar papa-dextrosa (Continuación…)

QCAM	V8							Ca							TTA							PDA						
	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T	S	E	C	O	F	M	T
7623	L	LE	B	LO	I	F	76.8	A	LE	B	LO	C	F	89	AC LB	PB EC	B	LO	I	F	75.5	ADC LB	U	B	O	I	F	40.1
7628	AD	EPL	B	O	C	F	89	AD	PB EC	B	O	C	F	89	AD	E R	B	O	C	F	74.4	ADC LB	U	B	O	I	F	53.8
7628*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	AD	E	B	O	C	F	69.4	–	–	–	–	–	–	–
7638	LC LAB	PC LEB	B	LO	C	F	89	LA	LE	B	LO	C	F	89	A	PB EC	B	O	I	F	87.6	ADC LB	U	B	O	I	F	76.6
7638*	A	E	B	O	C	F	89	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7643	A	E	B	LO	I	F	57.5	LA	P	B	O	C	F	89	LA	LE	B	LO	I	F	82.1	ADC LB	U	B	O	I	F	24.2
7643*	L	P	B	T	I	F	35.9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

*Repeticiones en las que hubo diferencias morfológicas en al menos un medio de cultivo.

A, algodonoso; AB, algodonoso hacia los bordes; ABI, algodonoso en el borde izquierdo; AC, algodonoso en el centro; AD, algodonoso denso; ADB, algodonoso denso hacia los bordes; ADC, algodonoso denso en el centro; B, blanco; C, circular; Ca, agar centeno A; CA, con colonias algodonosas; CAE, con colonias algodonosas elevadas; CO, color; E, elevado; EB, elevado hacia los bordes; EBI, elevado en el borde izquierdo; EC, elevado en el centro; EL, elevación; EPL, elevado con parches lisos; F, filiforme; FO, forma FR, finamente radiado; HTC, con halo traslúcido en el centro; I, irregular; L, liso; LA, ligeramente algodonoso; LAB, ligeramente algodonoso hacia los bordes; LB, liso hacia los bordes; LC, liso en el centro; LE, ligeramente elevado; LEB, ligeramente elevado hacia los bordes; LEC, ligeramente elevado en el centro; LO, ligeramente opaco; M, margen; O, opaco; OP, opacidad; P, plano; PB, plano hacia los bordes; PC, plano en el centro; PDA, agar papa-dextrosa; QCAM, Quito Católica

Micología; R, radiado; S, superficie/patrón de la colonia; T, traslúcido; TA, tamaño final de la colonia en mm; TTA, agar tomate de árbol; U, umbonado; V8, agar V8 10%.