

## DETERMINACIÓN DEL TIPO DE APAREAMIENTO CON MARCADORES MOLECULARES EN AISLAMIENTOS DE *Phytophthora infestans* RECOLECTADOS EN PLANTACIONES DE PAPA EN COSTA RICA<sup>1</sup>

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

**Palabras clave:** Tipo de apareamiento, marcadores moleculares, locus S, *Phytophthora infestans*, papa, Costa Rica.

**Keywords:** Mating type, molecular markers, locus S, *Phytophthora infestans*, potato, Costa Rica.

Recibido 05/03/04

Aceptado 09/06/04

### RESUMEN

El tipo de apareamiento de 88 aislamientos de *Phytophthora infestans* fue determinado mediante el uso de marcadores moleculares. Los aislamientos fueron recolectados entre marzo de 1999 y febrero del 2001 en zonas productoras de papa de Costa Rica. El ADN de cada uno de los aislamientos se extrajo de micelio cultivado en medio líquido. El tipo de apareamiento fue determinado mediante la técnica de PCR usando los imprimadores S1A y S1B, los cuales amplificaron el locus *SI* en los aislamientos con tipo de apareamiento A1. Todos los aislamientos evaluados resultaron con tipo de apareamiento A1. La ausencia del tipo de apareamiento A2 pareciera indicar que las poblaciones estudiadas están formadas únicamente por linajes clonales de tipo de apareamiento A1.

### ABSTRACT

**Molecular marker assessment of mating type of *Phytophthora infestans* isolates collected in potato fields of Costa Rica.** Mating type of 88 isolates of *Phytophthora infestans* was assessed using molecular markers. Isolates were collected from March 1999 to February 2001 in the potato-producing zones of Costa Rica. Isolates for DNA extraction were grown in liquid medium. Mating type was determined by PCR, using the S1A and S1B primers in order to amplify the *SI* mating type locus. All isolates showed only the A1 mating type; therefore, the lack of mating type A2 can be an indication that the populations tested could be formed only by clonal lineages with the A1 mating type.

### INTRODUCCIÓN

La papa es el cuarto cultivo más importante del mundo después del trigo, el maíz y el arroz; sin embargo, es número uno en productividad (FAO 1991, Estrada 2000). Al igual que otros

cultivos, la papa no está exenta del ataque de plagas y enfermedades, *Phytophthora infestans*, patógeno que causa la enfermedad conocida como tizón tardío en papa y tomate, constituye uno de los problemas mayores para la producción de estos cultivos.

1/ Este trabajo forma parte de la tesis de MSc. del primer autor. Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

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

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

*Phytophthora infestans* es un oomicete heterotálico con 2 tipos de apareamiento designados arbitrariamente como A1 y A2 (Gallegly y Galindo 1958). Cada tipo de apareamiento es bisexual, capaz de producir oogonios y anteridios a partir de la diferenciación de su micelio vegetativo. Cuando ambos tipos de apareamiento están presentes, ocurre la fusión entre gametangios de tipos opuestos, lo cual resulta en la formación de una oospora-espora sexual- (Galindo y Gallegly 1960). Ambos tipos de apareamiento son considerados grupos de compatibilidad y no formas sexuales, ya que el anteridio u oogonio de un tipo puede aparearse con el oogonio o anteridio, respectivamente, del tipo opuesto (Galindo y Gallegly 1960). Contrario a las especies heterotálicas, como *P. infestans*, en las especies homotálicas de este género no hay diferenciación de tipos de apareamiento, por lo que la formación de la oospora ocurre a partir de la fusión de gametangios de un mismo individuo (Erwin y Ribeiro 1996).

Hasta inicios de la década de 1980, México era el único lugar donde había sido reportada la presencia natural de ambos tipos de apareamiento en *P. infestans* (Gisi y Cohen 1996). En esta región, ambos tipos de apareamiento se encuentran naturalmente en la misma frecuencia y la reproducción sexual es común en el campo, lo que genera una gran diversidad genética en las poblaciones de *P. infestans* (Niederhauser *et al.* 1954, Gallegly y Galindo 1958, Tooley *et al.* 1985, Goodwin *et al.* 1992), considerándose a México como el centro de diversidad de este patógeno. En otras regiones fuera de México sólo había prevalecido el tipo de apareamiento A1 (Smoot *et al.* 1958, Goodwin *et al.* 1994), dando origen a un único genotipo clonal distribuido mundialmente y denominado US-1, cuya reproducción es típicamente asexual (Goodwin *et al.* 1994).

La presencia del tipo de apareamiento A2 fuera de México fue mencionada por primera vez en Suiza en 1984 (Hohl e Iselin 1984) y subsecuentemente se informó en otros países de Europa y el mundo (Gisi y Cohen 1996). Este hecho, rompió las barreras que separaban la coexistencia de ambos tipos de apareamiento y abrió la posibilidad de la reproducción sexual del patógeno

fuera de México, para dar origen a genotipos más diversos y agresivos que aquellos que existían cuando la población era exclusivamente de reproducción asexual (Fry *et al.* 1993). A partir de este momento, hubo un incremento en la diversidad de genotipos del patógeno y un incremento en la epidemiología de la enfermedad (Fry y Goodwin 1997). Hoy día, se ha corroborado que la ocurrencia de la reproducción sexual de *P. infestans* fuera de México da origen a genotipos más agresivos y mejor adaptados los cuales desplazan las viejas poblaciones (Gavino *et al.* 2000).

Conocer el tipo de apareamiento en las poblaciones locales de *P. infestans* es una herramienta básica para entender la epidemiología del tizón tardío. Tradicionalmente, la determinación del tipo de apareamiento se lleva a cabo *in vitro* apareando el aislamiento desconocido con cada uno de los aislamientos control del tipo de apareamiento A1 o A2. Sin embargo, en lugares donde aún no se ha reportado la presencia del tipo de apareamiento A2, como Costa Rica, es prohibida la importación *in vivo* de este patógeno. Incluso, es prohibida la importación de cualquier cepa viva de *P. infestans* independientemente de sus características.

Debido a esta restricción cuarentenaria, a los problemas técnicos para la manipulación del patógeno y a la falta de un trabajo colaborativo con otros países, sólo un número limitado de aislamientos procedentes de Costa Rica ha podido ser analizado en otros lugares. Hohl e Iselin (1984), Goodwin *et al.* (1994) y Sanchez *et al.* (2000), evaluaron en total 16 aislamientos, resultando todos del tipo de apareamiento A1. No obstante, para un mejor entendimiento de la epidemiología del tizón tardío, es necesario llevar a cabo estudios poblacionales del patógeno que incluyan un mayor número de aislamientos. Para contrarrestar este problema, algunos países como Colombia, donde tampoco se ha reportado el tipo de apareamiento A2, han optado por introducir cepas vivas que les permitan realizar estos estudios, aún con el riesgo que este proceso conlleva (García 1997).

Una alternativa que puede ser aplicada para la determinación del tipo de apareamiento, sin necesidad de introducir al país cepas vivas del patógeno, es el uso de marcadores moleculares.

Judelson *et al.* (1995) encontraron que el locus *SI* en *P. infestans* está fuertemente ligado al tipo de apareamiento. Este locus se encuentra en el tipo de apareamiento A1 pero está ausente en el tipo de apareamiento A2. Basado en su conocimiento sobre este mismo locus, Judelson (1996a) desarrolló un par de imprimadores para llevar a cabo una reacción PCR (Polymerase Chain Reaction, Saiki *et al.* 1988), la cual permite la amplificación de un fragmento específico únicamente en los individuos A1. Esta nueva alternativa ha sido adoptada en países como Perú (Pérez *et al.* 2001), donde aún no existe el tipo de apareamiento A2.

El objetivo de este trabajo fue determinar, mediante el uso de marcadores moleculares, el tipo de apareamiento de una serie de aislamientos de *Phytophthora infestans* recolectados en plantaciones de papa en las principales zonas productoras de este cultivo en Costa Rica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos evaluados

Se evaluó una serie de 81 aislamientos de *Phytophthora infestans* recolectados en las 2 principales zonas productoras de papa en Costa Rica (Cartago y Zarcero). Además, se incluyó 3 aislamientos recolectados en San Joaquín de Flores (Heredia) y 4 aislamientos recolectados en la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica (Frajanes, Alajuela), las cuales son zonas no tradicionales de cultivo de papa. La recolección de los aislamientos se llevó a cabo de marzo de 1999 hasta febrero de 2001. De los 88 aislamientos usados en este estudio, 85 de ellos habían sido previamente evaluados para la resistencia al metalaxyl. Por lo tanto, en el estudio fueron incluidos tanto aislamientos resistentes como aislamientos sensibles.

Además, en la evaluación del tipo de apareamiento con los marcadores moleculares, se incluyó el análisis de ADN de un aislamiento control con tipo de apareamiento A1 y otro aislamiento control con tipo de apareamiento A2.

### Cultivo *in vitro*

Aislamientos puros de *P. infestans* cultivados *in vitro* en medio de centeno-B-agar (Caten y Jinks 1968), fueron subsecuentemente cultivados en un medio de arveja modificado (Erwin y Ribeiro 1996). Semillas de arveja congeladas (160 g) fueron trituradas con agua en una licuadora y la mezcla fue posteriormente centrifugada. El sobrenadante fue suplementado con 20 g de sacarosa y el volumen final fue ajustado a 1 litro. De este medio líquido, 8-10 ml fueron dispensados en frascos de vidrio tipo Gerber (7x5,5 cm) y esterilizados en una autoclave a 121°C por 20 min. Los aislamientos fueron cultivados en este medio por 15-20 días a 18°C y a la oscuridad. Después de este tiempo, el micelio producido fue cosechado y lavado con agua destilada estéril para eliminar los restos del medio de cultivo. Luego, el micelio fresco fue secado por filtración al vacío y almacenado pocas horas a -20 °C, antes de ser usado para la extracción de ADN. Cuando el micelio no fue usado, este fue liofilizado y almacenado a -20°C.

### Extracción de ADN

Se extrajo ADN de micelio fresco y liofilizado de aislamientos locales y de micelio liofilizado de aislamientos control con tipo de apareamiento conocido. El micelio liofilizado del aislamiento control US-1, con tipo de apareamiento A1, fue suministrado por el Centro Internacional de la Papa, Perú. El micelio liofilizado del aislamiento control US-18, con tipo de apareamiento A2, fue suministrado por la Universidad Estatal de Carolina del Norte, EE.UU.). El ADN de *P. infestans* fue extraído de acuerdo a metodologías estándar (Lee y Taylor 1990).

Entre 40-80 mg de micelio fresco secado por filtración al vacío, fue triturado en un tubo Eppendorf (1,7 ml) con un pistilo e incubado 1 h a 65°C en 0,5 ml de buffer de extracción (0,1 M Tris-Cl pH 8,0, 0,05 M EDTA pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,25% SDS, 0,7% 2-Mercaptoetanol). Cuando se usó micelio liofilizado, se tomó 10-15 mg de tejido y se agitó en 0,5 ml del buffer de extracción. Luego se agregó 1 vol (0,5 ml) de

fenol:cloroformo:isoamilalcohol 25:24:1 y se mezcló por inversión 5 min o hasta formar una emulsión. Fue centrifugado 3 min a 13200 rpm y el sobrenadante transferido a otro tubo agregando 1 vol de cloroformo:isoamilalcohol 24:1. De nuevo se mezcló y centrifugó pasando el sobrenadante a otro tubo y precipitando el ADN con 1/10 vol de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  y 2 vol de etanol frío. Se incubó a  $-20^\circ\text{C}$  por 30 min y luego se centrifugó. El pellet fue resuspendido en 100  $\mu\text{l}$  de TE (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  por 30 min con 1  $\mu\text{l}$  de ARNasa (10 mg  $\text{ml}^{-1}$ ). Para purificar el ADN, se agregó 300  $\mu\text{l}$  de TE, se repitió los lavados con fenol:cloroformo y la precipitación con etanol. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 100  $\mu\text{l}$  de TE y su calidad fue determinada por electroforesis en un buffer TBE 0,5 X (0,045 M Tris-Borato, 0,001 M EDTA pH 8,0) usando un gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio (0,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). La cuantificación de ADN se llevó a cabo con un fluorómetro.

### Amplificación del ADN

El ADN de los aislamientos costarricenses y control de *P. infestans* fue amplificado con el uso de los imprimadores S1A (5'-AGGATTCAACAA-3') y S1B (5'-TGCTTCC-TAAGG-3'), los cuales amplifican un fragmento de 1,4 Kb, perteneciente al locus *SI*, si el aislamiento tiene el tipo de apareamiento A1. Si el aislamiento tiene el tipo de apareamiento A2, no se produce la amplificación del fragmento de 1,4 Kb. La figura 1 muestra la amplificación del locus *SI* en diferentes aislamientos de *P. infestans*. Como los imprimadores S1A y S1B sólo amplifican un fragmento de 1,4 Kb en el tipo de apareamiento A1 y no en el A2, se usó una reacción control que amplifica el locus de apareamiento (locus *BI*) con los imprimadores B1R y B1A2, los cuales amplifican un fragmento de 0,38 ó 0,34 Kb en ambos tipos de apareamiento. La figura 2 muestra la amplificación del locus *BI* en diferentes aislamientos de *P. infestans*.

La reacción de PCR consistió en: 1X buffer TK (20 mM Tris-Cl pH 8,4 y 50 mM



Fig. 1. Amplificación del locus *SI*, usando los imprimadores S1A y S1B, en diferentes ADNs de *Phytophthora infestans* con tipo de apareamiento A1 o A2 (tomado de Judelson 1996a). M= marcador de peso molecular.

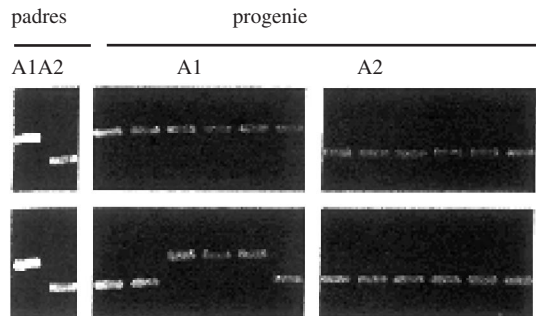


Fig. 2. Segregación de alelos del locus *BI*, usando los imprimadores B1R y B1A2, en ADN de los padres y la progenie de *Phytophthora infestans* (tomado de Judelson 1996b).

KCl); 0,1% Triton® X-100; 0,01% BSA; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 125 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP); 1 U de la enzima Taq ADNpolimerasa almacenada en buffer B (20 mM Tris-Cl, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0,5% Tween®20 y 0,5% Nonidet®-P40); 0,5 mM de los imprimadores S1A/S1B o 0,5 mM de los imprimadores B1R/B1A2; y 10 ng de ADN de *P. infestans*. Todas las reacciones fueron amplificadas a  $94^\circ\text{C}$  por 30 s; 35 ciclos de  $94^\circ\text{C}$  por 30 s (desnaturalización),  $45^\circ\text{C}$  por 30 s (alineamiento),  $72^\circ\text{C}$  por 60 s (extensión);  $72^\circ\text{C}$  por 3 min (extensión final). Luego de la amplificación, los productos fueron analizados por electroforesis en un buffer TBE 0,5 X usando un gel de agarosa (1,6%) con bromuro de etidio (0,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y visualizados con luz UV. En todos los casos para la evaluación de las bandas en el gel de agarosa se utilizó un marcador molecular estándar derivado del ADN de un bacteriófago lambda digerido con las enzimas de restricción *EcoRI*+*HindIII*.

### Apareamiento *in vitro* de aislamientos vivos

Como una prueba adicional al uso de marcadores moleculares para determinar el tipo de apareamiento de los aislamientos de *P. infestans*, se tomó al azar una serie de 40 aislamientos, de los 88 evaluados en este estudio y cada uno de ellos fue apareado *in vitro* con un mismo aislamiento seleccionado al azar. Las pruebas de apareamiento fueron realizadas en medio de centeno-B-agar. Los platos fueron incubados a 18°C y a la oscuridad; la presencia de oosporas se evaluó después de 3 semanas.

La hipótesis establecida fue: Si no se observa la presencia de oosporas en ninguno de los 40 apareamientos todos los aislamientos evaluados pertenecen a un mismo tipo de apareamiento. Si se observa la presencia de oosporas en alguno de los 40 apareamientos, existen ambos tipos de apareamiento (A1 y A2).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 2 tipos de apareamiento que existen naturalmente en *P. infestans*, sólo se encontró el tipo de apareamiento A1 en los 88 aislamientos analizados en el estudio (Cuadro 1). Esta determinación fue posible mediante la amplificación del locus *SI* en cada una de las muestras, como se presenta en la figura 3. En dicha figura se observa como los aislamientos costarricenses tienen el mismo fragmento amplificado de 1,4 Kb que el aislamiento control US-1,

Cuadro 1. Evaluación del tipo de apareamiento en aislamientos de *Phytophthora infestans*. Los aislamientos fueron recolectados en plantaciones de papa en Costa Rica, durante el período 1999-2001.

Zona	Tipo de Apareamiento		Total
	A1	A2	
Cartago	55	0	55
Zarcero	25	0	25
Fraijanes	4	0	4
Heredia	4	0	4
Total	88	0	88

con tipo de apareamiento A1, a su vez, dicho fragmento se encuentra ausente en el aislamiento control US-18, con tipo de apareamiento A2. Ambos aislamientos control han sido previamente apareados *in vivo* en otros lugares, ratificando su comportamiento como A1 y A2.

Para corroborar que la ausencia de producto en el tipo de apareamiento A2 se debe a la especificidad del imprimador y no a un problema de la reacción PCR, se llevó a cabo una reacción paralela con los imprimadores B1R/B1A2, los cuales amplifican el locus de apareamiento A2 (Figura 4).

Los resultados anteriormente expuestos a partir de la amplificación del locus *SI* (Figura 3), tienen su sustento en el hecho de que dicho locus está fuertemente ligado al tipo de apareamiento A1 y es un locus nulo en el tipo de apareamiento A2 (Judelson *et al.* 1995). Esta estrecha asociación entre la presencia o ausencia del locus en

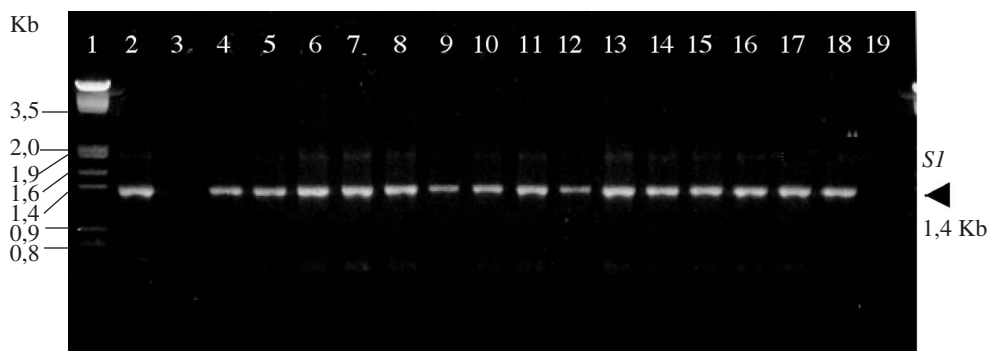


Fig. 3. Amplificación del locus *SI*, con los imprimadores S1A y S1B, en diferentes aislamientos de *Phytophthora infestans*. Línea 1, marcador de peso molecular. Línea 2, aislamiento control US-1 con tipo de apareamiento A1. Línea 3, aislamiento control US-18 con tipo de apareamiento A2. Líneas 4-18, aislamientos costarricenses con tipo de apareamiento A1. Línea 19, reacción PCR sin ADN.

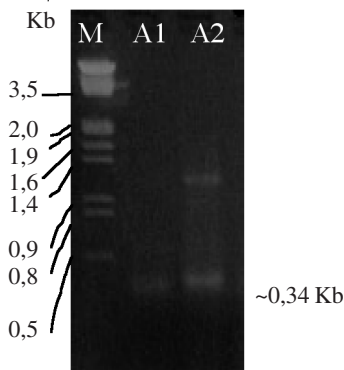


Fig. 4. Amplificación del locus *BI*, con los imprimadores B1R y B1A2. M=marcador de peso molecular A1=aislamiento US-1. A2=aislamiento US-18.

aislamientos con tipo de apareamiento A1 o A2, respectivamente, ha sido demostrada en diferentes colecciones de *P. infestans* procedentes de México, Perú, Estados Unidos, Holanda, Reino Unido, Alemania, Polonia, Japón y Egipto (Judelson 1996a). Otros estudios con hibridación de ADN (Judelson *et al.* 1995), han mostrado que el locus *SI* es hemicígote en el tipo de apareamiento A1, es decir, que existe sólo un alelo del locus; además, no existen secuencias relacionadas con este en el tipo de apareamiento A2. Una característica del locus *SI* es su condición aberrante, el cual no produce ningún transcrito de ARN; pero forma una región conservada cerca del locus del tipo de apareamiento (locus *BI*) (Judelson *et al.* 1995).

De esta manera, la determinación del locus *SI* se ha convertido en una herramienta alternativa al apareamiento *in vivo*, que también ha sido usada en otros lugares. Pérez *et al.* (2001) determinaron el tipo de apareamiento en poblaciones peruanas de *P. infestans* mediante la presencia del locus *SI*, ya que en Perú tampoco se ha reportado la presencia de aislamientos con tipo de apareamiento A2.

La prueba adicional del apareamiento *in vivo* de 40 aislamientos realizada en este estudio, siguiendo los protocolos estándar, ratifica que sólo existió un tipo de apareamiento, debido a que no se observó la presencia de oosporas en ninguno de los aislamientos. Los estudios previos por Hohl e Iselin (1984), Goodwin *et al.* (1994) y

Sanchez *et al.* (2000) con un total de 16 aislamientos costarricenses, recolectados de papa y tomate, muestran resultados concordantes con este estudio, ellos también encontraron sólo aislamientos con tipo de apareamiento A1. En el presente estudio además de la prueba adicional del apareamiento *in vivo* de los 40 aislamientos, fueron evaluados 8 aislamientos provenientes de 2 zonas no tradicionales de producción de papa (Cuadro 1), esto como una prueba más para corroborar que nuestras plantaciones de papa se encuentran libres del tipo de apareamiento A2, tal y como se puede observar en el mismo cuadro estos 8 aislamientos resultaron negativos para el tipo de apareamiento A2.

Probablemente, la ausencia del tipo de apareamiento A2, en las plantaciones de papa de Costa Rica, se deba a diversas razones. No obstante, el proceso de migración de *P. infestans* es el fenómeno que mejor ha explicado la aparición de nuevas cepas en una población, y por supuesto la aparición del tipo de apareamiento A2 en diferentes lugares del mundo (Spielman *et al.* 1991, Goodwin y Drenth 1997). En Costa Rica, la implementación de un sistema nacional de certificación de semilla de papa a inicios de la década de 1970 y las regulaciones impuestas a la importación de semilla, pudieron formar, desde ese momento, una barrera para la migración de nuevas cepas.

Así, con la presencia única del tipo de apareamiento A1, en las plantaciones de papa, se asume que las poblaciones estudiadas son del tipo clonal, ya que en ausencia del tipo de apareamiento A2 la reproducción del patógeno es exclusivamente asexual. De esta manera, las poblaciones clonales tienden a formar linajes, los cuales incluyen toda la descendencia asexual de un genotipo en particular (Fry y Goodwin 1997), es decir, todos aquellos aislamientos que pertenecen a un solo genotipo forman un linaje. No obstante, para definir un linaje clonal en *P. infestans* se necesita marcadores fenotípicos y genotípicos tales como el tipo de apareamiento, la sensibilidad al fungicida metalaxyl, las aloenzimas GPI (glucosa-6-fosfato isomerasa) y PEP (peptidasa), y un patrón de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Fry *et al.* 1993).

Las poblaciones analizadas en este estudio están formadas por diferentes genotipos, los cuales es necesario identificar en el futuro. Sin embargo, la presencia de aislamientos resistentes y sensibles al fungicida metalaxyl, mencionados en un artículo previo (Páez *et al.* 2001), se podrían considerar como linajes diferentes.

Si bien, la presencia del tipo de apareamiento A2 en lugares donde antes no existía fue la mayor evidencia de cambios en las poblaciones de *P. infestans*, las poblaciones formadas por linajes clonales con tipos de apareamiento A1 tienen también la capacidad de cambiar rápidamente, hasta el punto de aumentar su patogenicidad y resistencia a los fungicidas (Fry y Goodwin 1997). La frecuencia de mutaciones en estos linajes, no necesita ser excesivamente alta para explicar los cambios, ya que una sola lesión puede producir cientos de miles de esporangios, y en un campo infectado podrían existir billones de ellos en ciclos que sólo alcanzan 3 días bajo condiciones ambientales favorables (Erwin y Ribeiro 1996, Goodwin y Drenth 1997).

El concepto de linaje clonal es importante para entender la biología poblacional de *P. infestans* y para poder explicar cambios en una población de reproducción asexual. Actualmente, 2 cambios son evidentes en las poblaciones estudiadas: la resistencia al fungicida metalaxyl, discutida en Páez *et al.* (2001), y un gran número de factores de virulencia (M. Barquero, comunicación personal 2004). Se asume que ambos cambios, según los resultados obtenidos, han ocurrido bajo una dinámica de la población con reproducción asexual. En el primer caso, la resistencia al fungicida metalaxyl existe en baja frecuencia y esta puede ser seleccionada (Daggett *et al.* 1993), mientras que una mayor virulencia en estas poblaciones clonales puede ser el resultado de interacciones patógeno-hospedero más complejas estimuladas por un amplio rango de hospederos.

En resumen, la ausencia del tipo de apareamiento A2, en las plantaciones de papa en Costa Rica, le confiere a los productores una ventaja en los esfuerzos por combatir esta enfermedad, ya que no existe la reproducción sexual del patógeno, la cual eventualmente, podría generar variabilidad genética y adaptabilidad con mayor rapidez. Por otro lado,

saber que las poblaciones existentes tienen un solo tipo de apareamiento, permite un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad, debido a que la reproducción de estas poblaciones es exclusivamente asexual, entonces los cambios en estas estarían dados por factores diferentes a la variación sexual.

El hecho de no haberse encontrado A2 en Costa Rica, significa también que no hay formación de oósporas, las cuales son estructuras que pueden resistir condiciones adversas, y complicar aún más el manejo de la enfermedad. Habiendo solo A1, el hongo solo puede sobrevivir en tejidos vivos, lo cual facilita el manejo del inóculo primario. Lo anterior sería imposible si el hongo sobrevive como oóspora.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Comisión Europea a través del proyecto INCO-DC: "Exploitation of the genetic biodiversity of wild relatives for breeding potatoes with sustainable resistance to late blight (*Phytophthora infestans*)".

## LITERATURA CITADA

- CATEN C.E., JINKS J.L. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. Canadian Journal of Botany 46:329-348.
- DAGGETT S.S., GÖTZ E., THERRIEN C.D. 1993. Phenotypic changes in populations of *Phytophthora infestans* from Eastern Germany. Phytopathology 83:319-323.
- ERWIN D.C., RIBEIRO O.K. 1996. Phytophthora diseases worldwide. APS PRESS. St. Paul, Minnesota, USA. 562 p.
- ESTRADAN N. 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA/CID/CIP. Centro de Información para el Desarrollo. La Paz, Bolivia. 372 p.
- FAO. 1991. Production Year Book. Vol. 45. FAO Statistics Series No. 102.
- FRY W.E., GOODWIN S.B., DYER A.T., MATUSZAK J.M., DRENTH A., TOOLEY P.W., SUJKOWSKI L.S., KOH Y.J., COHEN B.A., SPIELMAN L.J., DEAHL K.L., INGLIS D.A., SANDIAN K.P. 1993.

- Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77:653-661.
- FRY W.E., GOODWIN S.B. 1997. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *BioScience* 47:363-371.
- GALINDO J., GALLEGLY M.E. 1960. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 50:123-128.
- GALLEGLY M.E., GALINDO J. 1958. Mating type and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48:274-277.
- GARCIA C. 1997. A propósito de la introducción de aislamientos de *Phytophthora infestans* para investigación en Colombia. *Agronomía Colombiana* 14:154-157.
- GAVINO P.D., SMART C.D., SANDROCK R.W., MILLER J.S., HAMM P.B., YUN LEE T., DAVIS R.M., FRY W.E. 2000. Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: Generation of an aggressive lineage. *Plant Disease* 84:731-735.
- GISI U., COHEN Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology* 34:549-572.
- GOODWIN S.B., SPIELMAN L.J., MATUSZAK J.M., BERGERON S.N., FRY W.E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* in Northern and Central Mexico. *Phytopathology* 82:955-961.
- GOODWIN S.B., COHEN B.A., FRY W.E. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academic Sciences USA* 91:11591-11595.
- GOODWIN S.B., DRENTH A. 1997. Origen of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology* (10):992-999.
- HOHL H.R., ISELIN K. 1984. Strains of *Phytophthora infestans* from Switzerland with A2 mating type behaviour. *Transactions of British Mycological Society* 83:529-530.
- JUDELSON H.S., SPIELMAN L.J., SHATTOCK R.C. 1995. Genetic mapping and non-mendelian of mating type in the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* 141:503-512.
- JUDELSON H.S. 1996a. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans*. *Molecular Gene Genetics* 252:155-161.
- JUDELSON H.S. 1996b. Genetic and physical variability at the mating type locus of the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* 144:1005-1013.
- LEE S.B., TAYLOR J.W. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. *In: PCR protocols: A guide to methods and applications*. Ed. by Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. Academic. USA. 482 p.
- NIEDERHAUSER J.S., CERVANTES J., SERVIN L. 1954. Late blight in Mexico and its implications. *Phytopathology* 44:406-408.
- PÁEZ O., GÓMEZ L., BRENES A., VALVERDE R. 2001. Resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxyl en el cultivo de la papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 25(1):33-44.
- PEREZ W.G., GAMBOA S., FALCON Y.V., COCA M., RAYMUNDO R.M., NELSON R.J. 2001. Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* (10):956-965.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 23:487-491.
- SANCHEZ V., SHATTOCK R.C., BUSTAMANTE E. 2000. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* nativos de Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (CR)* 55:36-42.
- SMOOT J.J., GOUGH F.J., LAMEY H.A., EICHENMULLER J.J., GALLEGLY M.E. 1958. Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 48:165-171.
- SPIELMAN L.J., DRENTH A., DAVIDSE L.C., SUJKOWSKI L.J., GU W., TOOLEY P.W., FRY W.E. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*?. *Plant Pathology* (40):422-430.
- TOOLEY P.W., FRY W.E., VILLAREAL-GONZALEZ M.J. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *The Journal of Heredity* 76:431-435.