

# ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENETICA DE LAS POBLACIONES DE *Phytophthora infestans* EN LAS REGIONES PRODUCTORAS DE PAPA EN COLOMBIA

Maldonado, L.Y.<sup>1</sup> ; Delgado, M.C.<sup>2</sup> ; García, C.<sup>3</sup>

## INTRODUCCIÓN

*Phytophthora infestans* es un patógeno, principalmente de papa y tomate, aunque esta reportado en otras solanáceas. Causa la enfermedad conocida en Colombia como gota de la papa, en otras regiones del mundo se le conoce como tizón tardío o lancha. *P. infestans* se originó en México como patógeno en plantas nativas de la familia Solanaceae, aunque no en los ancestros andinos de la papa (*Solanum tuberosum*) o del tomate (*Lycopersicon esculentum*). De México, *P. infestans* ha migrado en varios episodios al resto del mundo; aparentemente la primera migración tuvo lugar en la primera mitad del siglo 19 y culminó en Europa donde devastó los cultivos de papa y provocó las infames hambrunas de Irlanda de 1845 y 1846. Posteriormente, se reportó en Estados Unidos, y el resto de los continentes.

La diseminación a escala global de *P. infestans* fue favorecida por el amplio movimiento de material de propagación de papa a partir de Europa. Como las condiciones climáticas prevalentes en las zonas paperas de Europa limitaban severamente las poblaciones de áfidos y los niveles de incidencia de enfermedades virales eran bajos, se acostumbró importar tubérculos semilla de Europa para las siembras de papa en América del Sur, Africa, Oriente Medio y Asia. Esta práctica y la creciente liberalidad en el movimiento de material vegetal han facilitado nuevas migraciones del patógeno de México y subsiguientes invasiones a otras regiones (Matuszak et al., 1994).

En las poblaciones de *P. infestans* de México han estado presentes los dos tipos de apareamiento (conocidos como A1 y A2) necesarios para la reproducción sexual. Como la reproducción sexual permite la recombinación genética, las poblaciones del patógeno en México son muy complejas genéticamente. Aparentemente, en el inóculo de *P. infestans* que migró originalmente de México hacia Europa en 1840 solo estaba representado el tipo de apareamiento A1, por lo cual la reproducción de las poblaciones establecidas subsiguientemente era únicamente asexual. En consecuencia, las poblaciones del patógeno fuera de México tenían una variabilidad mínima y se consideraban un solo clon. El descubrimiento

---

<sup>1</sup> M.Sc. Asistente de Investigación Proyecto de Patología de Papa.

<sup>2</sup> L.B. Asistente de Investigación Laboratorio de Biotecnología.

<sup>3</sup> Ph.D. Profesora Asociada Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

del tipo A2 en Suiza, en 1984, fue el primer reporte de este tipo de apareamiento fuera de México; este hallazgo estimuló la búsqueda del tipo A2 en otras partes del mundo, habiéndolo encontrado hasta el momento en Europa, Sur América, Estados Unidos y Canadá. Al parecer, el tipo A2 migró de México a Europa en 1976, en un cargamento de 25.000 toneladas de papa. De Europa, el tipo A2 se dispersó a otras partes del mundo (Goodwin et al, 1996).

La literatura fitopatológica abunda en ejemplos que ilustran diferencias en estructura genética entre poblaciones de patógenos con y sin reproducción sexual. Estas diferencias se han demostrado en poblaciones de *P. infestans* existentes en Estados Unidos y Canadá (lugares donde no ocurre la reproducción sexual del patógeno) y México (donde se lleva a cabo la reproducción sexual). La recombinación implícita en reproducción sexual puede incrementar la variabilidad genética, alterar la estructura de las poblaciones de *P. infestans* y generar genotipos más agresivos, con mayor éxito reproductivo y con combinaciones novedosas de virulencia (Samaucha & Gisi, 1987). En el Valle de Toluca, en la región central de México (en donde predomina la reproducción sexual del patógeno), se observó que las poblaciones de *P. infestans* contenían muchos individuos con numerosas virulencias específicas. En el Noreste de México, al igual que en México central, las poblaciones de *P. infestans* presentaron gran heterogeneidad, habiéndose detectado más de quince genotipos diferentes a partir de treinta y tres aislamientos de un solo campo de papa (Matuszak et al., 1994).

En Europa, los genotipos de *P. infestans* que se desarrollaron a partir de la aparición del tipo A2 fueron más agresivos y reemplazaron rápidamente los genotipos residentes de los lugares donde arribaron. Así, los genotipos observados en poblaciones de *P. infestans* colectadas entre 1951 y 1978 en los Países Bajos, no fueron encontrados en 1982, y en su lugar se detectaron nuevos genotipos. Idénticos resultados se reportaron en Japón. Esta evidencia indica que algunos de los genotipos inmigrantes, o generados por reproducción sexual, son más adaptados a las circunstancias de manejo del cultivo de papa (incluyendo rutinas de manejo genético y químico), y poseen mayor éxito reproductivo a través de una mayor capacidad de esporulación y una mayor tasa de supervivencia que los genotipos nativos o derivados de la reproducción asexual, y ha permitido estimar la velocidad con que ocurren cambios en la composición genética de poblaciones de *P. infestans* (Davidse et al., 1981; Dowley & O'Sullivan, 1981).

En lo que concierne a América Latina, se han reportado cambios poblacionales de *P. infestans* en Brasil, y Ecuador. En la mayoría de los

casos, estos cambios han agravado o complicado el manejo de la gota, generalmente por reducciones en el nivel de sensibilidad a los fungicidas de alta especificidad. Estos cambios son atribuibles a recombinaciones genéticas locales a través de la reproducción sexual, o a migraciones directas de nuevos genotipos de otras regiones.

Las variedades de papa sembradas en Colombia son altamente susceptibles a este patógeno, y la protección de las cosechas está basada en el uso de fungicidas. Si la enfermedad no es controlada a tiempo puede ocasionar pérdidas hasta del 100%. Para su control se hacen en promedio unas 10 aplicaciones por ciclo de cultivo. Los fungicidas que se utilizan con mayor frecuencia son productos protectantes con base en el ingrediente activo genérico mancozeb y el fungicida sistémico metalaxyl. Mancozeb (etilen-bis-ditiocarbamato de manganeso + Zn) es un protectante de amplio espectro cuyo efecto es de contacto. Metalaxyl (N-[2,6-dimetilfenil]-N-[metoxiacetil]-alanina metil ester), en cambio, es un producto sistémico de efecto curativo y específico para organismos en el orden Peronosporales (Oomycota). La especificidad de un fungicida conlleva un riesgo directo a que se desarrollen genotipos con sensibilidad reducida. En efecto, entre más alta la especificidad de un fungicida, tanto en grupos taxonómicos afectados como en su modo de acción, mayor la probabilidad de que se presente pérdida de sensibilidad (más comúnmente referida como desarrollo de resistencia) hacia el producto en las poblaciones de patógenos. Cuando la acción de un fungicida se ejerce en un proceso metabólico con rutas alternativas y muy particular de determinados grupos taxonómicos (Oomicetes, en el caso del metalaxyl), solo se requieren una o muy pocas mutaciones para que la resistencia se establezca. Además, la alta capacidad reproductiva de estos organismos y el uso continuado de los químicos contribuyen a que la frecuencia de resistencia se incremente rápidamente en las poblaciones de patógenos, haciendo su control todavía más difícil. Existen varios informes de aislamientos resistentes en *P. infestans*, y otros Peronosporales (Deahl, et al., 1993). En donde quiera que se han presentado aislamientos resistentes, la dificultad en el control de la enfermedad se ha extremado.

No obstante, que existe un mayor conocimiento sobre la enfermedad, la presencia de nuevos genotipos altamente virulentos hace necesario caracterizar las poblaciones de *P. infestans*, para lo cual se pueden usar marcadores como tipos de apareamiento A1 y A2, sensibilidad al metalaxyl, patrones electroforéticos de aloenzimas, análisis de DNA y pruebas de virulencia (Therrien, 1993).

## **2. OBJETIVOS**

Los objetivos de este estudio son caracterizar las poblaciones de *P. infestans* presentes en las zonas paperas de Colombia, mediante la determinación de los tipos de apareamiento A1 y A2, la estructura genética y el nivel de sensibilidad al fungicida metalaxyl.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1 Zona de Muestreo y Aislamiento del Patógeno**

Se colectaron 39 aislamientos del patógeno en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca durante los años 2001 y 2002. Para esto, se hicieron recorridos por los principales municipios productores de papa de cada Departamento (Anexo1). En cada sitio visitado, se tomaron muestras de follaje con síntomas de la enfermedad. Las muestras colectadas se llevaron al laboratorio, donde se aisló el patógeno siguiendo la metodología descrita por González (1997), utilizando rodajas de papa de la variedad Tuquerreña como trampa, después que el patógeno produjo esporangios en la rodaja de papa, se cultivó en medio de agar arveja, para su mantenimiento y posterior evaluación. Se utilizó el DNA de aislamientos US-7 y US-8 como controles positivos, con tipo de apareamiento A2, el cual fue suministrado por la Universidad de Cornell.

### **3.2 Identificación de los Haplotipos mtDNA**

Una vez que los aislamientos fueron purificados y se obtuvo suficiente micelio en agar arveja, se procedió a cultivarlos en medio líquido agar-arveja a 16 °C por 8 días. El micelio obtenido fue lavado con agua destilada estéril y sometido a maceración con nitrógeno líquido. El macerado resultante se incubó a 65 °C con el buffer de extracción, una hora después se adicionó acetato de potasio 5 M y se mantuvo en hielo por 20 minutos; la mezcla fue centrifugada a 10.000 g por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. El DNA obtenido fue precipitado con isopropanol y centrifugación a 10.000 g por 5 minutos, el pellet fue resuspendido en buffer Tris- EDTA pH 8.

La calidad y concentración del DNA fue observada por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

El DNA extraído fue sometido a amplificación con 4 pares de primers, que fueron elaborados con base en la secuencia de regiones polimórficas del

genoma mitocondrial de *P. Infestans*.(Griffith, 1998). Las reacciones de amplificación se optimizaron en 30  $\mu$ l de volumen total y cada reacción fue preparada con Buffer PCR 1 X, 100  $\mu$ M de cada dNTP, 2.0 mM de  $MgCl_2$ , 0.325  $\mu$ M de cada uno de los primers y 1 unidad de *taq* Polimerasa (Invitrogen). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Perkin Elmer  $\text{\textcircled{R}}$  2400.

Los fragmentos amplificados se sometieron a digestión utilizando *CfoI*, *MspI* y *EcoRI* para los primers P1, P2, P3 y P4 respectivamente. La mezcla de digestión se preparó con 1 unidad de enzima y buffer de restricción 1X, incubando a 37  $^{\circ}$ C durante una hora.

Los productos digeridos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y los haplotipos se determinaron según los patrones de restricción obtenidos. Se utilizó la escalera de 100 pb (Invitrogen), como marcador de peso molecular.

### **3.3 Determinación de los Tipos de Apareamiento A1 y A2**

El tipo de apareamiento se determinó mediante el uso de los primers específicos S1A y S2B que amplifican una región ligada al locus de apareamiento. La banda que se obtiene de 1250 pb corresponde al locus *S1*, que está presente en A1 pero ausente en A2 (Judelson, 1996). Se utilizó el DNA de los aislamientos US-7 y US-8 como control positivo de A2.

Se utilizó el protocolo propuesto por Judelson, el cual se modificó para las condiciones del laboratorio, se estandarizó la concentración de  $MgCl_2$  y la temperatura de hibridación de los primers. El protocolo comprende un volumen final de 25  $\mu$ l y 37  $^{\circ}$ C como temperatura de hibridación de los primers, la mezcla de reacción contiene 2.0 mM de  $MgCl_2$ , 125  $\mu$ M de dNTPs, 2  $\mu$ M de cada primer y 1 unidad de *taq* polimerasa (Invitrogen).

### **3.4 Evaluación de los niveles de sensibilidad de *P. infestans* a metalaxyl**

La respuesta de los diferentes aislamientos a Metalaxyl se evaluó por comparación del crecimiento radial del micelio en agar arveja enmendado con el fungicida contra el crecimiento de los mismos aislamientos en medio sin fungicida. La concentración evaluada fue de 100 ppm. Se dispensaron 20 mL de medio enmendado en cajas de petri de 9 cm de diámetro. En el centro de cada caja se sembró un disco de 1.2 cm de

diámetro tomado del borde de una colonia de 8 días que creció en el mismo medio sin enmendar. Las cajas se incubaron a 18 °C en oscuridad. Cada concentración se evaluó en cinco repeticiones. El diámetro de cada colonia se midió a los 8 días de incubación y se transformó a diámetro relativo (DR), tomando como referencia el diámetro de la colonia de cada aislamiento en medio sin fungicida (Deahl,1993).

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados derivados de los ensayos de PCR del genoma mitocondrial de estos aislamientos mostró patrones electroforéticos IIa, estos patrones corresponden a fragmentos de 1118 pb con el primer P1, 720, 203 y 147 pb para el primer 2, 1308pb para el primer 3 y 603,394,361 pb para el primer 4.

En cuanto a los tipos de apareamiento los resultados muestran la amplificación del fragmento de interés, indicando que los aislamientos evaluados exhiben un único tipo de apareamiento, el A1. Estos resultados son consistentes con trabajos anteriores, (González, G. 1997) en el sentido de que las poblaciones de *P. infestans* de Cundinamarca y Boyacá son del tipo A1.

Por otro lado los aislamientos US-7 y US-8 presentaron haplotipo Ib y tipo de apareamiento A2.

De los 39 aislamientos colectados 8 tuvieron crecimiento lento en medio sin enmendar, por lo cual no fueron incluidos en el estudio.

De los aislamientos evaluados 3 no crecieron en medio enmendado. El crecimiento relativo de los aislamientos varió entre 5.85% (aislamiento 1050) y 142.70% (aislamiento 1049).

De acuerdo con la distribución de frecuencias con base en el crecimiento relativo en 100 ppm (Tabla 1), la presencia de polimorfismo en cuanto a sensibilidad a metalaxyl dentro de la población de *P. infestans* se revela una diferenciación en tres grupos A, B, C, (Figura 1). Se observa que el 42.85% corresponden a fenotipos sensibles (grupo A) con un crecimiento relativo que varía de 0 a 20 % (15 aislamientos), fenotipos con resistencia intermedia que conforman el grupo B, (42.85% ) presentaron un crecimiento relativo entre 40 a 100% (15 aislamientos) y el grupo C con 14.2%, que corresponde al fenotipo resistente, con un crecimiento relativo entre 100 y 160% (5 aislamientos). Estos resultados revelan una

población de *P. infestans* heterogénea en cuanto a sensibilidad a metalaxyl.

En cuanto a la distribución geográfica, no existe una relación entre el sitio de procedencia y el nivel de resistencia al funguicida.

## **5. CONCLUSIONES**

La ausencia del tipo de apareamiento A2 y el hallazgo del tipo electroforético IIa, revela la presencia de un solo linaje matrilineal en las muestras evaluadas, permitiendo postular el predominio de la reproducción asexual de *P. infestans* en la población analizada. Este dato es coherente con otros trabajos reportados con anterioridad y por otros autores. La presencia de los aislamientos con polimorfismo en cuanto a sensibilidad a metalaxyl se puede atribuir a otras fuentes de variabilidad diferentes a la recombinación sexual.

## **6. RECOMENDACIONES**

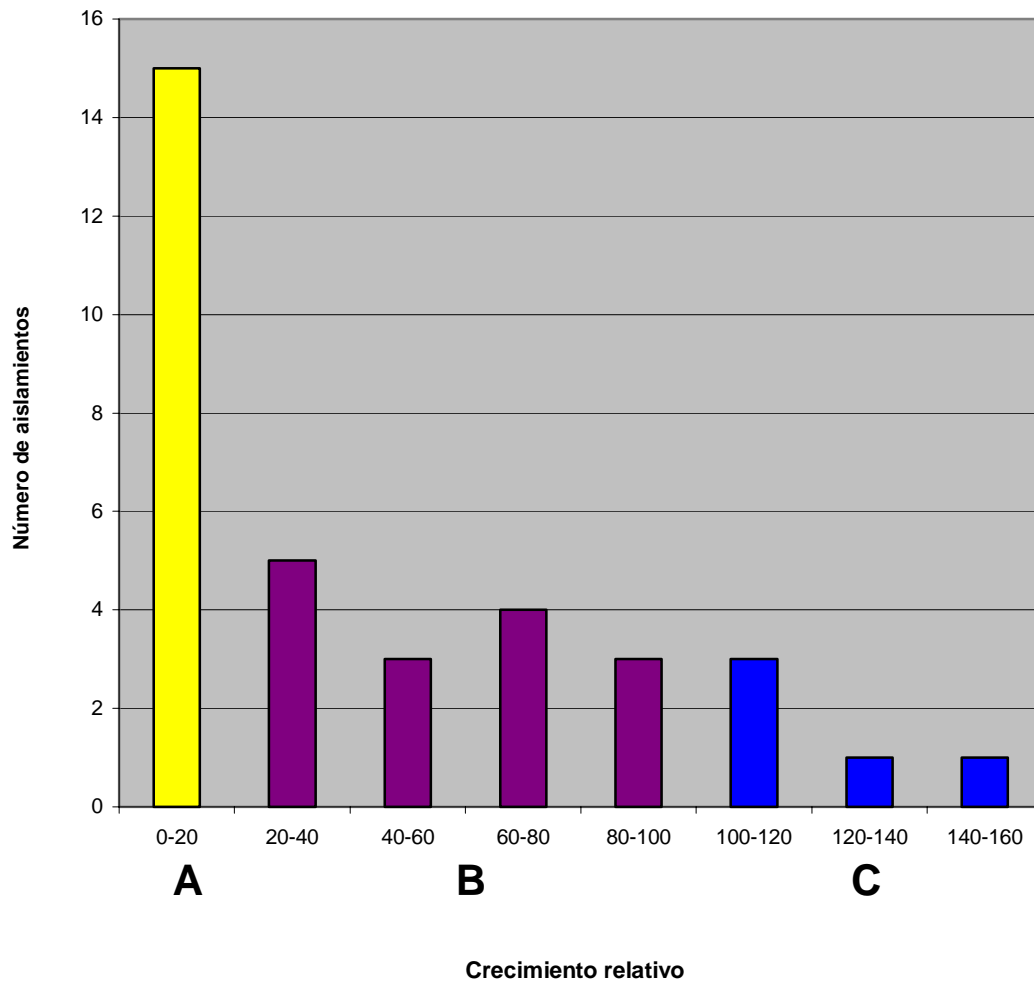
Aunque los análisis de aislamientos provenientes de Boyacá y Cundinamarca de *P. infestans* indican que el tipo A2 no está presente en estas regiones se debe continuar con la búsqueda, dada la dinámica de cambio en las poblaciones residentes y la posibilidad de migraciones que hace necesario un monitoreo constante de la estructura de estas.

Tabla 1. Estructura genética de las poblaciones de *P. infestans*

Aislamiento	Tipo de apareamiento	Haplotipos mtDNA	Diámetro relativo 100 p.p.m.
1020	A1	Ila	109.52
1021	A1	Ila	24.35
1022	A1	Ila	12.35
1023	A1	Ila	N.D.
1024	A1	Ila	118.68
1025	A1	Ila	51.81
1026	A1	Ila	72.55
1027	A1	Ila	20.58
1028	A1	Ila	N.D.
1029	A1	Ila	0
1030	A1	Ila	0
1031	A1	Ila	N.D.
1032	A1	Ila	N.D.
1033	A1	Ila	N.D.
1034	A1	Ila	82.77
1035	A1	Ila	15.48
1036	A1	Ila	N.D.
1037	A1	Ila	N.D.
1038	A1	Ila	11.11
1039	A1	Ila	18.64
1040	A1	Ila	106.15
1041	A1	Ila	13.40
1042	A1	Ila	13.65
1043	A1	Ila	94.44
1044	A1	Ila	24.39
1045	A1	Ila	9.41
1046	A1	Ila	59.0
1047	A1	Ila	80.46
1048	A1	Ila	15.15
1049	A1	Ila	142.70
1050	A1	Ila	5.85
1051	A1	Ila	128.07
1052	A1	Ila	12.37
1053	A1	Ila	N.D.
1054	A1	Ila	26
1055	A1	Ila	0
1056	A1	Ila	14.89
1057	A1	Ila	20.45
1058	A1	Ila	57.97
1059	A1	Ila	16.66
US-7	A2	Ib	N.D.
US-8	A2	Ib	N.D.

N. D. = No datos.

**Figura 1.** Distribución de frecuencias de *Phytophthora infestans* con base al crecimiento relativo en 100 ppm ia de metalaxyl



En sitios donde se presentaron aislamientos resistentes se debe reforzar el control de la enfermedad y un seguimiento regular de los mismos para detectar posibles cambios en la población.

Consideramos importante hacer una búsqueda del tipo A2 en las especies silvestres de solanaceas presentes en Colombia.

## **7. IMPORTANCIA E IMPACTO EN LA CADENA PRODUCTIVA**

El conocimiento de la presencia de reproducción sexual y resistencia a metalaxyl en poblaciones de *P. infestans* en Colombia tendrá repercusiones inmediatas sobre el desarrollo y el uso de clones de papa y variedades de tomate con resistencia genética.

El aumento en niveles de sensibilidad a metalaxyl es una llamada de alerta para reforzar la educación al agricultor acerca de la necesidad de un correcto uso del funguicida.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Davidse, LC, Looijen, D, Turkensteen, LJ & Van der Wal, D. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistance strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. Neth. J. Plant Path. 87:65-68.

Dowley, LJ & O'Sullivan, E. 1981. Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Ireland. Potato Res. 24:417:421.

Deahl, KL., Inglis, DA., y DeMuth, SP. 1993. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from northwestern Washington. American Potato Journal, 70: 779-795.

Deahl, KH, DeMuth, SP, Pelter, G & Ormond, DJ. 1993. First report of resistance of *Phytophthora infestans* to metalaxyl in Eastern Washington and Southwestern British Columbia. Plant Dis. 77:429.

Gonzalez, G. 1997. Caracterización de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (mont) de Bary en el altiplano Cundiboyacense con base en el tipo de apareamiento y sensibilidad al funguicida metalaxyl. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía Universidad Nacional de Colombia.

Goodwin, SB, Ludwik, S, Sujkowski, S & Fry, WE. 1996. Widespread distribution and probable origen of resistance to metalaxil in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. Phytopathology 86:793-800.

Griffith, G., Shaw, D. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes are Detected after PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or from Host Lesions. Applied and Enviromental Microbiology.64: 4007-4014

Judelson, H. 1996. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of the oomycete *Phytophthora infestans* . Molecular Gen Genetic. 252: 155-161

Kadish, D, Cohen,Y. 1988. Estimation of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. Phytophology 78: 915-919.

Matuszak, JM, Fernandez-Elquezabal, J, GU, W-K, Villarreal-Gonzalez, M. & Fry, WE. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populatios to metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. Plant Dis. 78:911-916.

Pedraza, V. 1973. Estado de la investigación sobre enfermedades fungosas y bacteriales en el cultivo de la papa en Colombia. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía. Bogotá.

Samaucha, Y, y Gisi, U. 1987. Use of two- and three-way mixtures to prevent development of resistance to phenylamide fungicides in *Phytophthora* and *Plasmopora*. *Phytopathology* 77:1405-1409.

Therrien, CD, Tooley, PW, Spielman, LJ, Fry, WE, Rith, DL & Shelly, SE. 1993. Nuclear DNA content, allozyme phenotypes and metalaxyl sensitivity of *Phytophthora infestans* from Japan. *Mycol. Res.* 97:945-950

## ANEXO 1.

## AISLAMIENTOS COLECTADOS EN EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA

Municipio	Vereda	Cultivar	Edad	No. Aislamiento
Chocontá	Tilatá parte baja	P. pastusa	3.5 meses	1020
Villapinzón	La Merced	P. pastusa	3.5 meses	1021
Carmen de Carupa	Charquira	P. pastusa	2 meses	1022
Carmen de Carupa	Charquira	Tuquerreña	4 meses	1023
Carmen de Carupa	Muchagua	P. pastusa	3.5 meses	1024
Subachoque	La pradera	P. pastusa	3 meses	1025
Subachoque	El guamal	Criolla	3 meses	1026
Subachoque	El páramo	P. pastusa	3 meses	1027
Subachoque	Pantano de Arce	P. pastusa	2.5 meses	1028
Subachoque	Puente piedra	P. pastusa	5 meses	1029
Villapinzón	Agua clara	P. pastusa	2.5 meses	1030
Villapinzón	Hato de rojas	P. pastusa	3 meses	1031
Villapinzón	Conguita	P. pastusa	3 meses	1032
Villapinzón	Conguita alto	P. pastusa	3.5 meses	1033
Villapinzón	El Salitre	P. pastusa	2 meses	1034
Facatativa	La tribuna	P. pastusa	4 meses	1035
Facatativa	Pasoancho	D. capiro	4.5 meses	1036
Subachoque	Puente piedra	D. capiro	6 meses	1037
Chocontá	Caretera central	D. Capiro	5 meses	1040
Chocontá	Vía Machetá	P. Pastusa	3 meses	1041
Lenguazaque	Farasía	Tuquerreña	4 meses	1042
Lenguazaque	Alto las cruces	P. pastusa	5 meses	1043
Guatavita	Desconocida	P. pastusa	4 meses	1059

## AISLAMIENTOS COLECTADOS EN EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ

Municipio	Vereda	Cultivar	Edad	No. Aislamiento
Chiquinquirá	La balsa	P. pastusa	3 meses	1038
Saboya	Vínculo- quebradita	P. pastusa	5 meses	1039
Ventaquemada	Blancas	P. pastusa	Toyas	1044
Ventaquemada	Blancas	P. pastusa	6 meses	1045
Ventaquemada	Parroquia vieja	P. Pastusa	5 meses	1046
Paipa	Peaje	Tuquerreña	4 meses	1047
Tuta	Desconocida	Ica única	4 meses	1048
Tuta	Vía Toca	P.pastusa	5 meses	1049
Toca	La leonera baja	P. pastusa	4 meses	1050
Toca	La leonera alta	P. pastusa	2 meses	1051
Siachoque	Comechoque	P. pastusa	4 meses	1052
Siachoque	Desconocida	P. pastusa	5 meses	1053
Soracá	Desconocida	P. pastusa	5 meses	1054
Soracá	Herrera alta	P. pastusa	5 meses	1055
Tunja	Desconocida	P. pastusa	5 meses	1056
Tunja	Chorro blanco alto	P. pastusa	5 meses	1057
Ventaquemada	Desconocida	Ica Huila	3 meses	1058

## ANEXO 2

