UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

ENSEÑAR LA EXPLOTACIÓN DE LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE

Dirección General de Investigación y Posgrado

Maestría en Ciencias en Protección Vegetal

"DIVERSIDAD GENÉTICA DE TIZÓN TARDÍO DE LA PAPA (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary) BAJO APLICACIÓN DE FUNGICIDAS EN METEPEC, EDO. MÉXICO".

TESIS

PRESENTA:

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO
MEXICO
DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
FICHA DE EXAMENES PROFESIONALES

EDUARDO BADILLO LÓPEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

Chapingo, México. Diciembre 2017

DIVERSIDAD GENÉTICA DE TIZÓN TARDÍO DE LA PAPA (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary) BAJO APLICACIÓN DE FUNGICIDAS EN METEPEC, EDO. MÉXICO.

Tesis realizada por **Eduardo Badillo López** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: _____

DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR: _____

DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESOR: _____

M. C. MERCEDES MARÍA CUENCA MONROY

ASESOR: _____

DR. SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVÍA

AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la oportunidad de formarme profesionalmente.

Al Posgrado en Protección Vegetal por el gran acervo brindado a través de la plantilla de profesionales que lo conforman, los cuales proporcionan constante e incondicionalmente el apoyo a los alumnos que se forman en sus aulas.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por su atinada dirección y apoyo, así como por haber dado todas las facilidades para realizar esta investigación y la confianza mostrada durante la estancia en este Posgrado.

A la M. C. Mercedes María Cuenca Condoy por su apoyo, empeño y asesoramiento en la realización del presente trabajo de investigación. Así como por su amistad y apoyo incondicional, de la misma manera por fomentar en mí la aspiración de superación y el deseo de sobrepasar los retos a los que me enfrente en la vida profesional.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos por su apoyo y amistad y consejos brindados en mi estancia en Chapingo.

A la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía por sus acertadas correcciones en el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Francisco Miguel de Cara García y al Instituto de Investigación y Formación Agrícola y Pesquera (IFAPA) de Almería, España, por el apoyo y la oportunidad de hacer estancia en sus instalaciones y ampliar mis conocimientos.

A todos los que de una o de otra manera formaron parte de mi estancia en la escuela brindándome su apoyo, amistad, consejos, alegrías y enojos, por toda una vida que formamos juntos durante nuestra estancia en Chapingo.

DEDICATORIAS

A dios, por la oportunidad de vivir y conocer a grandes personas en mi formación profesional y personal.

A mi madre Delia López Gutiérrez por la vida que me dio, las noches de desvelo y sus oraciones, sus consejos y enseñanzas.

A mi padre José Román Badillo Amador por su apoyo incondicional durante mi formación profesional, así como sus consejos y regaños, que al momento los tome a mal, pero a lo largo de la vida me enseñaron a ser de mi una persona fuerte que sabe tomar sus daciones. Además, por los esfuerzos que ha tenido que hacer para mantener unida a la familia y conducirnos por el mejor camino.

A mi hermano Guillermo Román y mis hermanas Sandra Edith y Diana Alina, por sus consejos, alegrías y tristezas que hemos compartido.

A mis sobrinos Lesly Johari, Donovan Román y Edwin Norberto por formar parte y traer alegría y motivos para seguir adelante a la familia.

A mis amigos: Frank Marín, Paola Cubillos, Benito Bello, Víctor Hernández, Jessica Ramírez, Gabriela Ramírez, Héctor Valdés, Manuel Rivera, Daniel Ramírez, Iván Díaz, Melissa Maldonado, a mis compañeros de maestría, por todos los momentos que hemos tenido juntos.

A la Familia Marín Gómez por su apoyo brindado durante mi estancia pre-profesional, así como su gran amistad que me han proporcionado, por eso gracias a Don Jesús y a doña Conchita.

A todos mis compañeros por su amistad…. sinceramente GRACIAS.

DATOS BIOGRÁFICOS

EDUARDO BADILLO LÓPEZ NACIÓ EN LA COMUNIDAD DE VIBORILLAS, HUAYACOCOTLA, VERACRUZ, EL 6 DE DICIEMBRE DE 1991, DONDE CURSÓ SUS ESTUDIOS DE EDUCACIÓN BÁSICA. EN EL AÑO 2007 INGRESÓ A LA PREPARATORIA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO, Y EN EL AÑO 2014 OBTUVO EL GRADO DE INGENIERO AGRÓNOMO ESPECIALISTA EN FITOTECNIA.

DURANTE SU DESARROLLO PROFESIONAL SE HA DESEMPEÑADO EN EL ÁREA DE SANIDAD VEGETAL, PARTICIPANDO EN ASESORAMIENTO FITOSANITARIO Y DE PRODUCCIÓN A PRODUCTORES DE FRUTALES Y CULTIVOS BÁSICOS EN EL DISTRITO 001 DE SAGARPA, CON SEDE EN HUAYACOCOTLA, ADEMÁS PARTICIPO COMO APOYO EN LA EMPRESA DE EXPORTACIÓN DE MANGO MAGMAR SPR DE RI, INVOLUCRADO EN EL ÁREA DE INOCUIDAD EN EMPAQUE Y CAMPO.

EN EL AÑO 2015 INGRESA AL POSGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL, PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO.

RESUMEN GENERAL

DIVERSIDAD GENÉTICA DE TIZÓN TARDÍO DE LA PAPA (*Phytophthora infestans* MONT. DE BARY) BAJO APLICACIÓN DE FUNGICIDAS EN METEPEC, EDO. MÉXICO.

GENETIC DIVERSITY OF POTATO LATE BLIGHT (*Phytophthora infestans* MONT. DE BARY) UNDER APPLICATION OF FUNGICIDES IN METEPEC, STATE OF MEXICO.

Eduardo Badillo-López[1], Héctor Lozoya-Saldaña[2*], Mercedes M. Cuenca-Condoy[3], Marcelo Acosta-Ramos[4], Sylvia P. Fernández-Pavía[5].

[1]Universidad Autónoma Chapingo. Instituto de Protección Vegetal. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C. P. 56230, México. [2]Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C. P. 56230, México.[3] Universidad Autónoma Chapingo. Instituto de Horticultura. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C. P. 56230, México.[4]Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitológica Agrícola. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C. P. 56230, México.[5]Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigación Agropecuaria y Forestal, Km 9,5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarimbaro, Michoacán, México. C.P. 58880. *(Autor para correspondencia). picti87@gmail.com teléfono (595) 952-1500 ext 5224.

El tizón tardío de la papa, cuyo agente causal es el Oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es la principal enfermedad de las Solanáceas. México es considerado como el centro de origen de dicho patógeno, siendo el Valle de Toluca el lugar donde presenta mayor diversidad genética, esto se debe en gran parte al uso irracional de fungicidas y a la presencia de grupos de compatibilidad. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar aislamientos de *P. infestans* provenientes de parcelas con diversos fungicidas, en el municipio de Metepec, Edo. México. La caracterización se realizó en base a la identificación de grupos de compatibilidad, grado de resistencia a metalaxil *in vitro,* y caracterización molecular mediante la secuenciación de las regiones de ARN ribosomal ITS y RPA 190. Las proporciones de tipo de compatibilidad entre las poblaciones fueron, A1: 0.571, A2: 0.314 y A1/A2: 0.114. Se indentificaron dos aislamientos resistentes a dosis altas de metalaxil y uno con resistencia intermedia. Mediante la secuenciacion y elaboracion de dendogramas se

formaron cinco grupos con caracteristicas similares, tanto de tipos de compatibilidad, nivel de resistencia a metalaxil y evaluación de fungicidas aplicados en campo, detectándose una gran diversidad genetica en las colectas.

GENERAL ABSTRACT

Potato late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Miont). De Bary, is the main disease of the Solanaceae. Mexico is considered the center of origin of this pathogen, with the Valley of Toluca being the place with the greatest genetic diversity, this is largely due to the irrational use of fungicides and the presence of compatibility groups. On the basis of this background, the objective of this work was to characterize *P. infestans* isolates obtained from plots sprayed with diverse fungicides in Metepec, State of México. The characterization was based on the identification of compatibility groups, degree of resistance to metalaxil in vitro, and molecular characterization by sequencing the ITS and RPA 190 ribosomal RNA regions. The proportions of compatibility type between populations were, A1: 0.571, A2: 0.314 and A1 / A2: 0.114. Two isolates resistant to a high dose of metalaxil and one with intermediate resistance were identified. Through the sequencing and elaboration of denograms, five groups with similar characteristics were formed, both types of compatibility, resistance level and metalaxil and evaluation of applications in the field, a great genetic diversity in the collections was detected.

Palabras clave: Tipos de compatibilidad, ITS, RPA 190, Resistencia a metalaxil.

Key words: Compatibility types, ITS, RPA 190, Metalaxil resistance.

ÍNDICE GENERAL

		Pág.
AGRADECIMIENTOS	……	iii
DEDICATORIAS	……	iv
DATOS BIOGRÁFICOS	……	v
RESUMEN GENERAL	……	vi
GENERAL ABSTRACT	……	vii
ÍNDICE GENERAL	……	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	……	xi
ÍNDICE DE CUADROS	……	xii
CAPÍTULO 1		
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL	……	1
1.2. OBJETIVO GENERAL	……	4
1.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS	……	4
1.4. HIPÓTESIS	……	4
CAPÍTULO 2		
II. REVISIÓN DE LITERATURA	……	5
2.1. Taxonomía y clasificación de *P. infestans*	……	5
2.2. Morfología del tizón tardío (*Phytophthora infestans)*	……	7
2.3. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*	……	7
2.3.1. Reproducción Asexual	……	8
2.3.2. Reproducción sexual	……	9

2.4. Síntomas de tizón tardío 9
2.4.1. Hojas 10
2.4.2. Tallos y peciolos 11
2.4.3. Tubérculos 11
2.5. Epidemiologia del tizón tardío 12
2.6. Origen y distribución de *Phytophthora infestans* 13
2.7. Características del patógeno 14
2.7.1. Tipos de apareamiento de *Phytophthora infestans* 14
2.7.2. Resistencia a metalaxil de *Phytophthora infestans* 15
2,7,3, Inter Transcribed Spacer (ITS) y RPA 190 de *P. infestans* 16
2.8. Efectos de los fungicidas en *P. infestans* 17
2.8.1. Fungicidas de contacto 17
2.8.2. Fungicidas sistémicos 18
2.9. LITERATURA CITADA 21

CAPÍTULO 3

RESUMEN 33
ABSTRACT 34
3.1. INTRODUCCIÓN 35
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS 37
3.2.1. Localización del experimento 37
3.2.2. Aislamiento del patógeno 37
3.2.3. Tipos de compatibilidad de *Phytophthora infestans* 39

3.2.4. Resistencia *in vitro* de *Phytophthora infestans* a metalaxil 39
3.2.5. Extracción de DNA de *Phytophthora infestans* 40
3.2.6. Amplificación de las regiones ITS y RPA 190 de *Phytophthora infestans* 41
3.2.7. Análisis de secuencias 42
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42
3.3.1. Aislamiento del patógeno 42
3.3.2. Tipos de apareamiento de *Phytophthora infestans* 42
3.3.3. Evaluación *in vitro* de resistencia a metalaxil *de Phytophthora infestans* 43
3.3.4. Extracción de DNA 46
3.3.5. Secuenciación y Análisis de secuencias 46
3.4. DISCUSIÓN GENERAL 53
3.5. CONCLUSIONES 54
3.6. LITERATURA CITADA 54

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Contenido	Pág.
	CAPITULO 2	
1	Ciclo de vida de *P. infestans*	8
2	Hojas con síntomas de tizón tardío colectados en Metepec, Edo. México	10
3	Síntomas de tizón tardío de la papa en tallos	11
	CAPITULO 3	
4	Dendograma construido con el utilizando el coeficiente de similitud de junta de vecinos y las secuencias ITS de los genotipos identificados en Metepec, Méx.	50
5	Dendograma construido con el utilizando el coeficiente de similitud de junta de vecinos y las secuencias RPA 190 de los genotipos identificados en Metepec, Méx.	51
6	Dendograma construido utilizando el coeficiente de similitud de junta de vecinos y las secuencias RPA 190 de los genotipos identificados en Metepec, Méx.	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
1	Fungicidas aplicados en campo de acuerdo a los aislamientos obtenidos.	38
2	Tipos de compatibilidad y categoría de resistencia a metalaxil de los genotipos colectados en Metepec, Edo. México	48
3	Concentraciones Letales 50 y 95 (CL_{50} y CL_{95}) de los aislamientos de *P. infestans* de los aislamientos colectados en colectados en Metepec, Edo. México.	49

CAPÍTULO 1.

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La papa (*Solanum tuberosum* L), pertenece a la familia de las Solanáceas, originaria del altiplano Sudamericano (Argentina) en donde se ha consumido desde hace más de 8 mil años. Los conquistadores españoles, a finales del siglo XVI, llevaron la planta a Europa y ya para el siglo XIX se había expandido por todo el continente, y es, en la actualidad, el tubérculo más importante dentro de la alimentación humana (Biarnes, Philippe, García y Santiago, 1995)

Un factor importante que afecta la producción de papa, son los problemas fitosanitarios (plagas y enfermedades), los cuales disminuyen tanto el rendimiento como la calidad del producto (Hooker, 1980). El problema de mayor limitación en el cultivo en gran parte de las regiones productoras del mundo, lo constituye la enfermedad conocida como tizón tardío cuyo agente causal es *Phytophthora infestans* (Mont de Bary), ya que puede devastar en poco tiempo los cultivos, causando pérdidas de hasta el 100%. Debido a que las condiciones climáticas en general en las que se cultiva este tubérculo, son propensas para el desarrollo de la enfermedad (Alarcón-Rodríguez et al., 2013; Jaramillo, 2003).

El tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más devastadoras la papa a nivel mundial. En 1845 causó en Irlanda la destrucción total de los campos de papa, que eran la principal fuente de alimentación de ese país, produciendo la muerte de miles de personas y la migración de muchos sobrevivientes a otros lugares de Europa y Norte América. Se reporta que la Gran hambruna Irlandesa fue causada por migraciones de *P. infestans* pertenecientes al tipo de apareamiento A1, posteriormente se dio una segunda migración del patógeno por todo el mundo, pero esta vez de genotipos más agresivos.

Para 1984 se identificó al oeste de Europa el tipo de apareamiento A2, el cual era considerado inexistente fuera de México (Arneson, 1998; Pérez y Forbes,

2008). A partir de 1956, se estableció al Valle de Toluca, México como centro de origen de *P. infestans*, siendo que allí fue donde se reportó por primera vez la presencia de ambos tipos de apareamiento (A1 y A2), permitiendo con ello la propagación sexual, conduciendo a una mayor diversidad genética del patógeno (Fry et al., 1993; Fry y Goodwin, 1997; Galindo y Gallergly, 1960; Tooley, Therrien y Ritch, 1989).

Debido a todo esto, se han realizado múltiples estudios etiológicos, epidemiológicos y moleculares que permiten conocer los peligros para la producción de papa, ocurridos después de la variación genética del patógeno, principalmente después de la aparición de variantes resistentes a fungicidas, con mayor virulencia y mayor aptitud parasítica.

La resistencia del patógeno a los fungicidas se ha desarrollado debido al uso inmoderado de dichas moléculas, aunado a esto la falta de capacitación para los aplicadores y el desconocimiento de los mecanismos y modos de acción de cada una de las moléculas empleadas en el control de la enfermedad, han provocado una mayor diversidad de genotipos de *P. infestans.* Estudios recientes han demostrado que la presencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las proteínas blanco de la acción fungicida y de secuencias específicas de nucleótidos de las regiones promotoras de dichos genes, se encuentran asociadas con la aparición de fenotipos resistentes a diversas moléculas químicas en organismos fitopatógenos (Damicone, 2004).

El metalaxil es un claro ejemplo de resistencia, actúa en sitios específicos del patógeno impidiendo la biosíntesis de proteínas mediante la interferencia de la síntesis del ARN ribosomal. Se ha reportado resistencia desde 1981 en diferentes partes del mundo (Europa, Estados Unidos de Norte América, Canadá, México y Ecuador), fungicida de gran importancia que aún se emplea en campo y es considerado como una variable adicional para caracterizar a *P. infestans* (Doster, Milgroom y Fry, 1990; Kato, Mizunuti, Goodwin y Fry, 1997; Dowley y O´Sullivan,

1985; Lozoya-Saldaña et al., 2017; Matuszak, Fernández, Gu, Villareal y Fry, 1994; Runno y Koppel, 2006,).

Conocer más las poblaciones locales de tizón tardío es de suma importancia para poder manejarlas, empleando para ello el conocimiento del tipo de apareamiento, los perfiles aloenzimaticos, haplotipos mitocondriales, la secuenciación de la información genética de los genes nucleares y mitocondriales, así como las regiones espaciadoras transcritas (ITS), de tal forma que provean de información suficiente para establecer un manejo contra el genotipo especifico de *P. infestans*, medidas que conlleven a realizar un manejo integral de la enfermedad, involucrando las medidas de prevención, cumplimiento de las normas sanitarias, el empleo de variedades resistentes, así como el uso adecuado de sustancias químicas (Alarcón-Rodríguez et al., 2013; Cárdenas et al., 2011; Gómez, Carbone y Ristaino, 2007; Tooley, Bunyard, Carras y Hatziloukas, 1997; Spielman et al., 1991).

Debido a lo anterior, la relevancia del patógeno y la necesidad de vincular criterios de clasificación, el objetivo de esta investigación fue caracterizar aislamientos de *Phytophthora infestans* de poblaciones obtenidas de parcelas con evaluación de fungicidas en Metepec, Edo, México, mediante el conocimiento de tipos de apareamiento, resistencia a metalaxil (método in vitro) y secuenciación de regiones ITS y RPA 190.

1.2. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar aislamientos de tizón tardío de la papa *(Phytophthora infestans* Mont. de Bary) bajo aplicación de fungicidas en Metepec, Edo. México.

1.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar los grupos de compatibilidad de los aislamientos de *P. infestans* de Metepec, Edo. México.
- Determinar *in vitro* la resistencia a metalaxil de los aislamientos de *P. infestans* de Metepec, Edo. México.
- Caracterizar y relacionar los aislamientos de *P. infestans* utilizando secuenciación de las regiones ITS y RPA 190 obtenidos de parcelas de Metepec, Edo. México.

1.4. Hipótesis

- Los fungicidas ejercen una presión de selección que conduce a una mayor variabilidad y resistencia a fungicidas de las progenies del Oomycete sobreviviente.

CAPÍTULO 2

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Uno de los grandes problemas que se tienen en el cultivo de papa es la enfermedad denomina tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont. de Bary). El cual a lo largo de la historia ha tenido gran importancia dentro del cultivo, la más relevante es la denominada “La Gran Hambruna Irlandesa”, qué a mediados del siglo XIX, causó la muerte de un gran sector de la población irlandesa, debido a que, en este país, la papa es uno de los cultivos base de su alimentación. De ahí que cuando se presentó este oomicete en los cultivos, se redujeron en gran medida las cosechas, provocando que la demanda del producto aumentara y al no tener un producto alternativo entre la población, esto ocasionó la muerte por falta de alimento entre los sectores más pobres (Jaramillo, 2003).

En la actualidad está enfermedad provoca grandes pérdidas a los productores, y ha sido uno de los principales temas de investigación, debido a que en México a diferencia de otros países, podemos encontrar los dos ciclos de vida de la enfermedad, es decir, se presenta su ciclo asexual y el ciclo sexual, lo cual provoca que sea más difícil su control, y con ello que exista una gran diversidad de razas de *P. Infestans* haciendo que el simple uso de agroquímicos, no sean suficientes para su control. Es aquí en donde surge el interés cada día de desarrollar nuevos productos químicos y conocer más de la morfología, anatomía y hábitos de crecimiento de la enfermedad (Damicone, 2004; Lozoya-Saldaña et al., 2017).

2.1. Taxonomía y clasificación de *P. infestans*

El Phylum Oomycota, pertenece al reino Cromista, con más de 700 especies, las cuales no tienen pigmentos fotosintéticos, poseen dos flagelos en las zoosporas y, paredes formadas por células o polímeros similares a celulosa y tienen hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la presencia de agua (Jaramillo,2003).

Raven, Evert y Eichhorm (1999) mencionan que, por la forma filamentosas de las hifas, se agrupaban originalmente como hongos. Siendo confirmado esto por las filogenias moleculares. Kamoun, Haber, Sobral, Nuss y Govers (1999), en diversos trabajos realizados basados en las secuencias de RNA ribosomal, en base a datos de los aminoácidos copilados para las proteínas de la mitocondria y cuatro proteínas que codifican para los genes cromosómicos, aportan evidencias de que los Oomycetes adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente de los hongos verdaderos.

Los Oomycetes, están más relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametos, por lo tanto, sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide. Son conocidos como organismos “heterocontes”, lo que significa que poseen flagelos en las zoosporas con longitud y ornamentación diferente. Los flagelos se presentan en pares, un flagelo largo y adornado con nastigonemas (pelos) distintivos (plumosos) y en flagelos más cortos, delgados, cilíndricos y en forma de látigos o flechas (Jaramillo, 2003).

Reven et al., (1999) y Ewin y Ribeiro (1996), citados por Jaramillo (2003), hacen la presente clasificación para *P. infestans.*

REINO: Cromista (Stramenipila)

PHYLUM: Oomycota

CLASE: Oomycete

SUBCLASE: Peronosporomycetidae

ORDEN: Pythiales

FAMILIA: Pythiaceae

GÉNERO: *Phytophthora*

ESPECIE: *infestans*

P. infestans (Mont) de Bary

2.2. Morfología de*Phytophthora infestans*

Presenta micelio cenocítico, es decir, no presenta septos o tabiques; los esporangios son ovoides, elipsoides a limoniformes, ahusados en la base, caducos, con un pedicelo menor a 3 mm y semipapilados. Su tamaño varía de 36 a 22 µm, los esporangióforos son de crecimiento continuo, con un pequeño hinchamiento justo por debajo del esporangio (Pérez y Forbes. 2008).

En los medios de cultivo el micelio se presenta aéreo, el cual puede ser marcadamente radiado o ligeramente estrellado, presentándose los bordes de la colonia redondeados o sinuosos y sumergidos en el medio siendo precisamente en este último en el que puede diferenciarse las protuberancias y engrosamientos, más o menos notables (Jaimasit y Prakob, 2010).

El micelio es capaz de vivir de forma saprófita sobre materia orgánica en el suelo en ausencia de hospedante. Sin embargo, según otros autores existe una invasión muy pobre de la materia orgánica por parte del micelio, y el movimiento de este través del suelo es muy pequeño o nulo (Echemendia, 2010).

2.3. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans es un organismo heterotálico con dos tipos de apareamiento, A1 y A2 (Alarcón-Rodríguez et al., 2013). Por lo cual el ciclo de vida (figura 1) del patógeno es algo difícil de predecir, teniendo diversas generaciones en un lapso corto de tiempo.

Se cree que este oomicete se originó en el centro de México y se distribuyó por todas las áreas paperas de América del Norte y sur, Europa, Asia y África. A partir de los años 1950´s, se estableció en el Valle de Toluca (México) como centro de origen de *P. Infestans,* debido a que en *Solanum tuberosum* se reportaron inicialmente la presencia de dos tipos de apareamiento A1 y A2, lo cual permite la propagación sexual y conduce a una mayor diversidad genética de *P. infestans* (Realpe, 2010).

Investigaciones de Fry y Goodwin (1995), revelan que a partir de 1981 se tienen reportes de la distribución del tipo de apareamiento A2 en varios países de Europa, Oriente medio, Asia y Sur América, lo que ha ocasionado que las poblaciones de tipo A1 sean desplazadas por nuevas variedades de tipo A1/A2. Surgiendo de la reproducción de ambos tipos de apareamiento, caracterizadas por su alta virulencia y variabilidad genética, lo que ha ocasionado que se amplió el número de hospederos y la adaptación a diferentes condiciones ambientales.

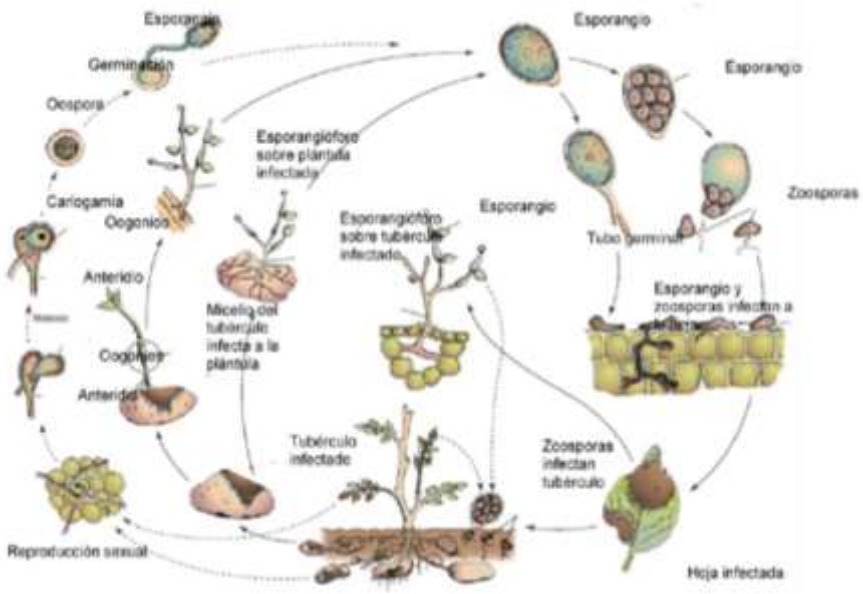

Figura 1. Ciclo de vida de *P. infestans* (Agrios, 2005)

2.3.1. Reproducción Asexual

En el agua y con baja temperatura, los esporangios germinan indirectamente produciendo alrededor de 8–12 zoosporas uninucleadas y biflageladas. Las zoosporas se forman dentro del esporangio y son liberadas cuando se rompe la pared esporangial a nivel de la papila lo cual les permite nadar libremente. Las zoosporas tienen dos flagelos diferentes: uno de los flagelos es largo y en forma de látigo, en tanto que el otro es más corto y ornamentado, con dos filas laterales de pelos en el extremo. Las zoosporas se enquistan sobre superficies sólidas, es decir, se detienen, adquieren una forma redondeada y forman una pared celular.

Posteriormente, en presencia de humedad, pueden desarrollar un tubo germinativo y penetrar a la hoja por los estomas, o formar el apresorio, de tal manera que la hifa de penetración ingresa directamente a través de la cutícula. Una vez dentro de la planta, el micelio se desarrolla intercelularmente formando haustorios dentro de las células. Ocasionalmente se forman haustorios en forma extracelular (Pérez y Forbes. 2008)

Cuando la temperatura es mayor a los 15°C, los esporangios pueden germinar directamente, formando un tubo germinativo que penetra la epidermis de la hoja e infectan al hospedante.

2.3.2. Reproducción Sexual

Los gametangios se forman en dos hifas separadas, por lo que *P. infestans* es heterotálico. Así, ambos tipos de apareamientos A1 y A2, deben estar presentes para que ocurra la reproducción sexual. La unión de los gametos ocurre cuando el oogonio atraviesa el anteridio y ocurre la plasmogamia. Esto conduce a la fertilización y al desarrollo de una oosporas con pared celular gruesa. La oosporas es resistente y puede sobrevivir en los restos vegetales. Bajo condiciones favorables, las oosporas producen un tubo germinativo que forma un esporangio apical, el cual puede liberar zoosporas o formar nuevamente un tubo germinativo, los cuales sirven como inóculo primario (Alarcón-Rodríguez et al., 2013)

2.4. Síntomas del Tizón tardío

El patógeno pasa el invierno como micelio en tubérculos infectados en bodegas o campo. El micelio crece alcanzando los brotes produciendo colapso celular. Cuando el micelio alcanza la parte aérea de la planta, produce las estructuras reproductivas (zoosporangios). Estas son dispersadas por el agua de lluvia y el viento, depositándose en hojas de tallos húmedos, donde inicia una nueva infección. Bajo condiciones húmedas, nuevos zoosporangios y zoosporas son formados, lo que origina una gran cantidad de nuevas infecciones que pueden ser producidas en una estación de crecimiento (Neuman, 2012).

Este patógeno se disemina por el viento, lluvia, agua del suelo hasta encontrar la planta hospedera, donde la zoospora se mueve en agua libre en los sustratos donde son liberadas desde los esporangios y tienen la capacidad de localizar las zonas de penetración de la planta (Alarcón-Rodríguez et al., 2013). Lucas, Shattock, Shaw y Cooke (1991) determinaron que las zoosporas se mueven sobre la superficie vegetal en gotas de agua hasta los estomas de la planta hospedante, mediante el fenómeno denominado quimiotaxia se activan quimiorreceptores que ocasionan su germinación que se adhieren a la superficie de las hojas o tallos.

2.4.1. Hojas.

Las manchas son de color marrón claro a oscuro, de apariencia húmeda, de forma irregular, algunas veces rodeadas por un hallo amarillento, no están limitadas por las nervaduras de las hojas (figura 2). Estos síntomas se presentan inicialmente en los bordes y puntas de las hojas. Bajo condiciones de alta humedad se forman en la cara inferior (envés) de las hojas unas vellosidades blanquecinas que constituyen las estructuras del patógeno (esporangióforos y esporangios). Las lesiones se expanden rápidamente, se tornan marrón oscuro, se necrosan y causan la muerte del tejido. En el campo, las plantas severamente afectadas emiten un olor característico, debido a la rápida descomposición del tejido foliar (Carrasco et al., 1997, Pérez y Forbes, 2008).

Figura 2. Hojas con síntomas de tizón tardío colectados en Metepec, Edo. México.

2.4.2. Tallos y pecíolos.

Las lesiones son necróticas, alargadas de 5-10 cm de longitud, de color marrón a negro, generalmente ubicadas desde el tercio medio a la parte superior de la planta, presentan consistencia vítrea (figura 3). Cuando la enfermedad cubre todo el diámetro del tallo, éstas se quiebran fácilmente al paso de las personas, equipos agrícolas o de vientos fuertes. En condiciones de alta humedad también hay esporulación sobre las lesiones del tallo, pero no muy abundante como se presenta en las hojas (Rubio, Rangel Flores*,* 2000).

Figura 3. Síntomas de tizón tardío de la papa en tallos colectados en Metepec, Edo. México.

2.4.3. Tubérculos.

Los tubérculos afectados presentan áreas irregulares, ligeramente hundidas. La epidermis toma una coloración marrón rojiza. Al realizar un corte transversal se puede observar unas prolongaciones delgadas que van desde la superficie externa hacia la medula a manera de clavija. En estados avanzados se nota una pudrición de apariencia granular de color castaño oscuro a parduzco, en estas puede ocurrir una pudrición secundaria causada por otro hongo (*Fusarium* spp.) y bacterias (*Erwinia* spp. *Clostridium* spp, etc.), provocando la desintegración del tubérculo y haciendo difícil el diagnostico (Flores, Lerdon, Bravo y Acuña, 2008).

2.5. Epidemiologia del tizón tardío

Donde no se presenta un ciclo sexual, la sobrevivencia del patógeno ocurre en forma de micelio en tubérculos de plantas voluntarias, tubérculos semilla o tubérculos desechados cerca a campos de cultivo. Los esporangios también pueden sobrevivir varios días e incluso semanas en suelo húmedo, sin embargo, no sobreviven temperaturas de congelación. Los brotes desarrollados a partir de los tubérculos infectados constituyen el inóculo inicial, el micelio crece a través del tallo y llega a la superficie del suelo. Cuando el micelio alcanza las partes aéreas de la planta, se forma los esporangios y estos son dispersados por el viento o salpicadura a las plantas vecinas. Los esporangios son producidos durante las noches húmedas y en la mañana son dispersados hacia las hojas para reiniciar el ciclo (Pérez y Forbes. 2008).

El tubo germinativo de los esporangios o de las zoosporas forman apresorios y mediante la hifa infectiva penetran principalmente por las células adyacentes a las células oclusivas de los estomas. También pueden penetrar la pared periclinal de las células epidermales y formar un micelio intercelular (Pérez y Forbes. 2008). Al cabo de unos cuantos días (4 días en condiciones óptimas: temperatura moderada y alta humedad) después de haberse producido la infección, emergen nuevos esporangióforos a través de los estomas y producen numerosos esporangios que infectarán otras plantas. En una sola campaña de cultivo pueden producirse varias generaciones asexuales del patógeno (Betancourth, Portilla y Salas, 2008).

En condiciones de humedad, los esporangios que se encuentran en hojas y tallos son lavados y arrastrados hacia el suelo, donde pueden producir zoosporas e infectar el tubérculo que se encuentra cerca de la superficie del suelo.

La infección se realiza a través de heridas o lenticelas. Una vez dentro de las células del tubérculo, se forman los haustorios de la misma manera que en las hojas y utilizan el contenido de las células como alimento. Puede producirse infección durante la cosecha, cuando los tubérculos son expuestos a follaje

contaminado o a esporangios todavía presentes en el suelo. La mayoría de estos tubérculos se pudren en el suelo por infecciones secundarias de otros microorganismos, producen infecciones bajo condiciones de almacenamiento inadecuado, o el micelio sobrevive hasta el próximo ciclo en los tubérculos semilla (Pérez y Forbes. 2008).

2.6. Origen y distribución de *P. infestans*

Se desconoce cuál es de centro de origen de *P. infestans*, diversos autores lo asocian a las zonas altas del centro de México, con especificación a la región del Valle de Toluca en el Estado de México, esta hipótesis está respaldada por la aparición y caracterización de ambos grupos de compatibilidad sexual (A1 y A2) aunado a esto la diversidad genética que se presenta en dicha región (Goodwin, Spielmnan, Matuszak, Bergeron y Fry, 1992; Lozoya-Saldaña, Guzmán-Galindo, Fernández-Pavía, Grünwald y Mcelhinny, 2005).

En la actualidad este patógeno se encuentra distribuido en todas las regiones productoras de papa y tomate (Fry et al, 2009). Se cree que el patógeno se distribuyó primero de América a Europa, probablemente de tubérculo semilla llevados de México y/o Sudamérica, de donde se distribuyó hacia el resto del mundo a través del comercio de semillas (Lozoya-Saldaña et al., 2017). Se sabe que las primeras migraciones del agente causal del tizón tardío estuvieron limitadas al grupo de compatibilidad A1, característica que se mantuvo por más de 100 años, siendo una cepa menos agresiva que el tipo A2, por su periodo de reproducción asexual más largo, es decir, la presencia de menos ciclos de vida del patógeno por ciclo de cultivo. Limitando únicamente la formación de zoosporas por la vía asexual (Alarcón-Rodríguez et al., 2013; Lozoya-Saldaña et al., 2017; Nienderhauser, 1991; Ordóñez et al., 2000).

La mayor diversidad genética de este Oomycete a nivel mundial se presenta en México, siendo las partes altas del centro del país, con especificación en los estados de México, Michoacán, Morelos y Tlaxcala, donde generalmente se presentan los dos tipos de apareamiento con una proporción 1:1 (Goodiwin, et

al., 1992, Grünwald Y Fili, 2005). Fernández-Pavía et al (2005) y Lozoya-Saldaña y Hernández-Vilchis (2001), han comprobado que en el valle de Toluca y Michoacán las poblaciones presentan reproducción sexual, siendo identificadas por la producción natural de oosporas.

2.7. Características del patógeno

Existen diferentes marcadores que permiten hacer una caracterización de aislamientos de *P. infestans*, se tienen marcadores fenotípicos (virulencia, tipo de apareamiento, resistencia a metalaxil), bioquímicos (Isoenzimas, haplotipos mitocondriales, polimorfismo en longitud de fragmentos de restricción) y moleculares (Secuenciación de genes nucleares o mitocondriales), sin embargo el empleo de marcadores morfológicos son influidos por las condiciones del medio, los análisis moleculares no presentan tantas dificultades y permiten además hacer las evaluaciones en diferentes periodos de desarrollo del patógeno (Alarcón-Rodríguez et al., 2013).

2.7.1. Tipo de apareamiento de *P. infestans*

Una de las líneas de caracterización de *P. infestans* es el tipo de apareamiento que presenta, esto se logra haciendo cruzas de los aislamientos de interés con una cepa tipo de compatibilidad conocido (A1 ó A2), enfrentando en medio de cultivo ambas cepas, para ver si hay cruzamiento, mediante la formación de oosporas (Alarcón-Rodríguez et al., 2013). Por otro lado, Judelson, Spielmnan y Shattock (1996) determinaron que el tipo de compatibilidad de *P. infestans* puede ser identificado mediante técnicas de PCR utilizando indicadores específicos, los cuales se relacionan con un signo o consecuencia de anormalidades estructurales, responsables de la segregación no mendeliana del tipo de apareamiento.

Se consideraba que el tipo de apareamiento A2 de *P. infestans* estaba solo en México, debido que fueron aislamientos provenientes del Valle de Toluca con los que se observó por primera vez la formación de oosporas, sin embargo, Shaw, Fyfe, Hibberd y Abdel-Sattar (1985), opinan que el tipo A2 pudo haber estado en

más países, solo que por sus bajas frecuencias no era posible detectarlo. Algunas otras investigaciones muestran que los tipos de apareamiento son alterados por las condiciones ambientales y manejo que se le da al patógeno, como García et al., (2000), quienes encontraron predominando al tipo A2 al norte de México en los años 1994-1995, pero entre los años 1996-1997 este tipo de apareamiento había prácticamente desaparecido.

2.7.2. Resistencia a metalaxil de *P. infestans*

La resistencia a metalaxil es una técnica muy utilizada en el estudio de *P. infestans*, esto se refiere a la capacidad que tienen las diferentes cepas silvestres que se pueden encontrar en los campos de cultivo, y su respuesta a un fungicida muy utilizado. Para evaluarla se recomienda seguir la metodología empleada por Shattock (1988) y Deahl y Demuth (1995), consistiendo en la inoculación de medio selectivo de agar centeno adicionados de micro concentraciones de fungicidas (10 mgL^{-1} y 100 mgL^{-1}) con fragmentos miceliares del Oomycete aislado.

Sozzi, Schwinn y Gisi (1992) y Manríquez (1995) consideraron 10 $mg \cdot L^{-1}$ como rango mínimo para determinar la sensibilidad a metalaxil. Locher y Lorenz (1991) determinaron un rango entre 10 - 100 $mg \cdot L^{-1}$ para metalaxil, fluazinam, Fosetil aluminio y propamocarb, sin embargo, en investigaciones más recientes realizadas por Rekanovic, et al., (2012) se probaron los mismos ingredientes activos y se determinó que con la concentración de 100 $mg \cdot L^{-1}$ fue posible determinar el nivel de resistencia del patógeno.

Shattock (1988) y Deahl y Demuth (1995), emplearon para evaluar la susceptibilidad y/o resistencia de las cepas de tizón tardío a metalaxil la siguiente ecuación:

$$PC = \frac{DMCM - 5\ mm}{DMCA - 5\ mm} * 100$$

Dónde: PC= Porcentaje de crecimiento; DMCM= Diámetro medio colonial; 5mm= diámetro del cilindro con micelio sembrado originalmente al centro de la caja Petri; y DMCA= Diámetro del crecimiento del testigo sin fungicida. El criterio de evaluación será resistente $\geq$ 60%, intermedio o tolerante de 10 a 60% y susceptible aquellos con un porcentaje de crecimiento radial $\leq$ 10%. Las comparaciones se evalúan bajo un diseño experimental completamente al azar.

2.7.3. Inter Transcribed Spacer (ITS) y RPA 190 de *P. infestans*

Las regiones de ADN mitocondrial y nuclear de *P. infestans* se han utilizado para conocer la historia evolutiva y estructural de la población, llevando a la definición de linajes de los datos moleculares, permitiendo el seguimiento de las poblaciones y dando lugar a la generación de inferencias epidemiológicas importantes sobre migración del patógeno (Carter, Archer, Buck, Shew, Shattock. 1990; Goodwin, Cohen y Fry. 1994; Goodwin, 1997).

Los genes del RNAr, se encuentran en unidades repetidas arregladas en tándem, los cuales se encuentran en sitios del cromosoma llamados regiones del organizador nuclear (NORs), agrupando al menos 3000 copias por celula. Cada repetición consiste en una región transcripta, conteniendo los genes 18S, 5.88S Y 28S RNAr, dicho fragmento transcrito se le conoce como ITS1 e ITS2. Dichas regiones permiten hacer una diferenciación de especies dentro del mismo género, teniendo el inconveniente de no ser útiles para diferenciar al interior de especies, debido al tamaño de la región y número de pares de bases involucradas en la secuenciación (Alarcón-Rodríguez et al., 2013; Cardenas et al., 2011; Guadet, Julien y Francois, 1989; Riethmüller, Potoenik, Milijasevic, Stepanovic, Todorovic, y Mihajlovic, 2002).

La región RPA 190 determinada por el gen A190 que codifica alrededor de 750 a 900 pb, es empleada en la caracterización de *P. infestans* debido a su asociación a mutaciones que confieren resistencia a fungicidas, en particular con metalaxil. El polimorfismo que proporciona dicha región da bases suficientes para poder hacer una diferenciación entre especies pertenecientes a *P. infestans* (Daayf,

Platt, Mahuku y Peters, 2001; Matson, Small, Fry y Judelson, 2015; Randall et al., 2014).

2.8. Efecto de fungicidas en *P. infestans*

Debido a la falta de cultivares resistentes, el uso de fungicidas sigue siendo la mejor medida de control el tizón tardío de la papa, sin embargo, las poblaciones de *P. infestans* han desarrollado resistencia a estos productos, si el cultivo no está protegido con fungicidas con diferentes modos de acción, el patógeno podría generar resistencia a algunos productos y los cultivos de papa se destruirían en cuestión de semanas (Abad y Ochoa, 1995; Díaz, Lozoya, Sahugun y Peña, 2014; Damicone, 2004; Zhu, et al. 2008).

Existen dos tipos de fungicidas utilizados para el control del tizón tardío; los de contacto, presentado acciones directas en el patógeno, afectando en sus fases de germinación y penetración, la acción de dichos fungicidas será efectiva siempre que persista en la superficie de la hoja. El otro tipo de fungicidas son los sintéticos, su movilidad dentro de la hoja o a través de ella le confieren un mayor control, pues afectan en diferentes puntos al patógeno (Fernández, Navia y Gandarilla, 1999; Lozoya-Saldaña et al., 2017).

2.8.1. Fungicidas de contacto

Los fungicidas de contacto, llamados también protectores, actúan solamente sobre la superficie de la planta donde el fungicida ha sido depositado y evitan que los esporangios germinen y penetran a las células. Por ello se recomienda cubrir la mayor parte de la planta con este tipo de producto (Pérez y Forbes, 2013).

A) Ditiocarbamatos (Mancozeb)

Los ditiocarbamatos Mancozeb) son un grupo de fungicidas de contacto, cuyo modo de acción seda durante la germinación de los esporangios y zoosporas, así como en el desarrollo micelial inactivando aminoácidos o procesos bioquímicos que involucran enzimas con grupos tioles, no son fitotóxicos, por lo que se pueden aplicar en diferentes etapas del cultivo (Schwinn y Margot, 1991).

B) Phtalimidas (Clorotalonil)

Dentro del grupo se encuentran los Phtalonitrilos (clorotalonil), quienes inhiben la respiración de las células del Oomycete, afectando las células fungosas atrapando al glutatión libre, previniendo la acividad (reducción) de la gliceroaldehido-3-fosfato dehidrogenasa y quizá otras enzimas generales (ISK-Biotech, 1990).

2.8.2. Fungicidas sistémicos

Los fungicidas sistémicos son absorbidos a través del follaje o de las raíces y se movilizan a toda la planta. Otros productos sistémicos, conocidos como fungicidas traslaminares, tienen la capacidad de moverse del lado superior de la hoja al inferior, pero no de una hoja a otra. Los fungicidas sistémicos afectan varias etapas de la vida del Oomycete (Pérez y Forbes, 2013).

A) Cianoacetamidas (Cimoxanil)

Uno de los grupos importantes de fungicidas sistémicos son los cianoacetamida (Cymoxanil), actúan sobre el patógeno inhibiendo la síntesis de ADN en el núcleo celular y la síntesis de ARN en el citoplasma de la célula de Oomycete, igualmente inhiben la síntesis de aminoácidos y lípidos, Afectando el desarrollo del micelio impidiendo la esporulación del patógeno. El fungicida presenta movimiento traslaminar, su persistencia en las plantas está limitado a pocos días (Ziogas, Markoglow, Theodosiou, Anagnostou, y Boutopoulou, 2006; Zhu, et al., 2008).

B) Carbamatos (propamocarb)

Los carbamatos (propamocarb) es un fungicida básicamente traslaminar con propiedades protectantes que controla Oomycetes reduciendo el crecimiento micelial, afectando la permeabilidad de la membrana celular, y el desarrollo de esporangios y zoosporas. Poco efectivo cuando el micelio está completamente

desarrollado. Se absorbe por la raíz y hojas y se trasloca acrepétalamente (García, Marín, Jaramillo y Cortes, 2008).

C) Morfinas (Dimetomorf)

Las morfinas en especial Dimetomorf, es uno de los fungicidas sistémicos empleados para el control de tizón tardío, este fungicida es traslaminar, antiesporulante, previendo la producción de esporangios y oosporas, además afectan la formación de la pared celular promoviendo sus lisis y la muerte celular (Rekanovi, et al., 2012). Leroux, Chabene y Bompeix (1993) lo consideran como buena opción, debido a que consideran que es de bajo riesgo para desarrollar resistencia por parte del patógeno.

D) Fenilamidas (metalaxil)

El compuesto (ingrediente activo) de mayor uso en el control de tizón tardío es el metalaxil, perteneciente al grupo de las fenilamidas, grupo sistémico con movimiento ascendente y descendente en la planta, siendo poco susceptible al lavado por la lluvia (Egan, Murray y Mullins, 1995). Dicho compuesto inhibe la síntesis de ARN inhibiendo la enzima RNA polimerasa, la síntesis de ARN ribosomal y por ende la síntesis de proteínas y reducción del crecimiento del micelio (Saville et al., 2015).

E) Madelamidas (Mandipromamida)

Este grupo tiene como modo de acción la inhibición de la síntesis de la celulosa de la pared celular a nivel de la proteína PiCesA3 celulosa sintetasa, algunos estudios registran la inhibición de la formación de hasustorios y de micelio (Blum, et al., 2010; Cohen, et al., 2007; Lozoya-Saldaña et al., 2017).

F) Imidazolinona (Fanamidone)

El fungicida fenamidone proviene de un nuevo grupo de moléculas derivadas de la Imidazolinona. Su rango de acción incluye un gran número de patógenos de la

clase Oomycetes, aunque también controla algunos hongos verdaderos perteneciente a la clase *Ascomycetes.* Está molécula actúa inhibiendo la respiración mitocondrial, al bloquear el trasporte de electrones a nivel de la ubihidroquinona en el complejo III (citocromo C oxidorreductasa), dicho modo de acción es similar al de las estrubilurinas y femoxadone (García, et al., 2008; Mercer y Latorse, 2003).

G) Cyano-Imidaziles (Cyazofamida)

La Cyazofamida del grupo de los Cyano-Inmidaziles, es un principio activo más reciente actuando en todas las etapas de desarrollo del patógeno. Posee actividad traslaminar actuando dentro del complejo bc1, en el sitio Q1, bloqueando los centros de energía del Oomycete e impidiendo así su desarrollo (Alor. 2015).

El conocimiento de la sensibilidad de los aislamientos de *P. infestans* a los fungicidas con diferentes modos de acción es muy importante para el desarrollo de estrategias de manejo de la enfermedad (Rekanovi, et al., 2012). Sin embargo, diversos estudios muestran que la aplicación continua de fungicidas con el mismo ingrediente activo o del mismo mecanismo de acción, ejercen una alta presión de selección sobre los patógenos, lo que provoca la disminución en la efectividad de estos productos al control del patógeno, dando como resultado una gradual resistencia en las poblaciones de *P. infestans,* (García et al., 2008; Rekanovi et al., 2012).

Se ha demostrado que la presencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las proteínas blanco de la acción fungicicola y de ciertas secuencias de nucleótidos ubicadas en las regiones promotoras de dichos genes se encuentran asociadas con la ocurrencia de varios fitopatógenos con genotipos resistentes a diversas moléculas químicas. La frecuencia de apariciones de dichos cambios genéticos está directamente asociada con la tasa de recombinación en los ciclos sexuales y para sexuales que presentan los hongos y Oomycetes (Damicone, 2004; García et al. 2008).

Diversos estudios atribuyen que los fungicidas son los causantes de mutaciones en poblaciones de *P. infestans*, Koh (1994) describió la existencia de ambos tipos de apareamiento en Japón desde 1937, antes de la diseminación del tipo A2. Sugiere que esto pudo deberse en una autocorrección del tipo A1 a la forma A2, inducida por un envejecimiento, exposición a fungicidas o diferentes tipos de estreses existentes. Calderón, Castro, Gilchrist, Márquez y Jaramillo (2002) sostienen que el incremento de la frecuencia del tipo A2 podría deberse a una mayor tolerancia a fungicidas como el metalaxil y una mejor adaptación a estreses provocados por condiciones climáticas adversas. Por otro lado, el cultivo continuo de variedades de papa con genes mayores ha podido contribuir a la selección de razas más agresivas del patógeno (Fry, 2008; Runno, Fry, Remmel, Mänd y Myers, 2010), esto fue demostrado por Flier y Turkensteen (1999) y Gavino, et al., (2000), quienes identificaron en el continente europeo, nuevos aislamientos más complejos y resistentes a fungicidas que poseían un periodo de latencia más reducido.

2.9. Literatura citada

Abad, J. A., and Ochoa, C. (1995). Historical evidence on occurrence of the late blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. Dublin, Ireland: Boole Press Ltd. 150: 36-41. Retrieved from https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1997.81.6.682

Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. Fith Edition. Elsevier Academic Press. U.S.A 922.

Alarcón-Rodríguez N., Lozoya-Saldaña, H., Valadez-Moctezuma, E., García-Mateos, M., y Colinas-León, M. (2013). Diversidad genética de tizón tardío de la Papa (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) en Chapingo, México. *Agrociencia* 47(6):593-607. Retrived from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s1405-31952013000600006&script=sci_abstract_&Ing=en.

Alor, R. N. A. (2015). Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata. Universidad de Lleida. 105-120. Retrieved from http://hdl.handle.net/10803/286188

Arneson, P.A. (1998). Tizón en: Biológica control. Universidad de Cornell. 37.

Betancourth, C., Portilla, E. y Salas, H. 2008. Evaluación de la reaccion de nuevos genotipos de papa (*Solanum tuberosum* subsp. andigena) al ataque de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Agronomía Colombiana 28(3): 411-416. Retrieved from http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/.

Biarnes, A., Philippe, C. J., García, M. R., y Santiago, C. M. (1995). Agronomía de la papa en México. Texcoco, México. Colegio de Posgraduados. 3-16.

Blum, M., Boehler, M., Randall, E., Youg, V., Csukai, M., and Kraus, S. (2010). Mandipropamid targets the cellulose synthase like PiCesA3 to inhibit cell Wall biosynthesis in the Oomycete plant pathogen, *Phytophthora infestans.* Molecular *Plant Pathology.* 11:227-243.

Calderón, H. J., Castro, M., Gilchrist, E., Márquez, E., y Jaramillo, S. (2002). Caracterización de las poblaciones de *Phytophthora infestans* presentes en los Departamentos de Boyacá y Cundinamarca. En: XXIII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología (ASCOLFI). Nuevas 138 Tendencias en Fitopatología. Bogotá, Colombia, 46p. Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/24340/1/21489-73409-1-PB.pdf

Cárdenas, M., Grajales, A., Sierra, R., Rojas, A., González, A., Vargas, A., Marín, M., Fermín, G., Lagos, L., Grünwald, K., Bernal, A., Salazar, C and Restrepo, S. (2001). Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region. Licensee BioMed Central Ltd. Facultad de Ciencias of the University of the Andes, Venezuela. 12: 56-71. Retrieved from https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-23

Carrasco, E; Estrada, N, Gabriel, J, Alfaro, G; Larondelle, Y; García, W; y Quiroga, O. (1997). Seis cultivares potenciales de papa con resistencia al

tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa.* 10:106-122. Retrieved from http://www.papaslatinas.org/ojs/index.php/rev-alap/article/view/84

Carter, D. A, Archer, S. A, Buck, K. W, Shaw, D. S, Shattock, R. C. (1990). Polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial de *Phytophthora infestans. Mycological Research* 94 (8): 1123-1128. Doi: 10.1016 / S0953-7562 (09) 81344-0.

Cohen, Y., Rubin, E., Hadad, T., Gotlieb, D., Sierotzki, H., and Gisi, U. (2007). Sensitivity of *Phytophthora infestans* to mandipropamid and the effect of enforced selection pressure in the field. *Plant Pathology* 56: 836-842. **Doi:** 10.1111/j.1365-3059.2007. 01625.x

Daayf, F., Platt, H., Mahuku, G., and Peters, R. 2001. Relationships between pathotypes and RAPDs, Gpi-Allozyme patterns, mating types, and resistance to Metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. *American Journal of Potato Research*. 78:129-139. Retrieved from https://doi.org/10.1007/BF02874768

Damicone, J. (2004). Fungicide resistance management. Cooperative Oklahoma Extensión Service EPP-7663. Stillwater. OK.

Duncan, J. M. 1999. *Phytophthora* and bidigin? threat to our crops. *Microbiol.* Today 26: 114-116. Retrived from http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Rendition-3508/F-7663web.pdf.

Deahl, K. L., and Demuth, S. P. (1995). Genetic and phenotypic diversity in populations of *Phytophthora infestans* In: The United States of America. Dublin. Ireland. EAPR, Boole Press.

Díaz, C. J. B., Lozoya, S. H., Sahagun, C. J., and Peña, L. A. (2014). The pathosystem *Solanum tuberosum* L.-*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo. México. Expected, observed, and simulated. *American*

Journal of Potato Research 91(3): 312-326. doi: 10.1007/s12230-013-9351-y

Doster, M. A. Milgroom, M. G., and Fry, W. E. (1990). Quantification of factors influencing potato late blight suppression and selection for metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*: A simulation approach. *Phytopathology* 80:1190-1198.

Dowley, L.J., and O´Sulivan, E. (1985). Monitoring metalaxil resistance in population of *Phytophthora infestans*. *Potato Research* 28:531-534. Retrieved from https://link.springer.com/article/10.1007/BF02357533

Echemedia, M. Y. (2010). *Phytophthora*: características, diagnósticos y daños que provoca en algunos cultivos tropicales, medidas de control. Instituto De Investigación En Fruticultura, Tropical. 15-25.

Ega A. R., Murray, A., Mullins, S., (1995). Past history and future prospects for fungcides for the control of *Phytophthora infestans* on potatoes. In: Dowley LJ, Bannon E, Cooke LR, Keane T, O´Sullivan E, eds. *Phytophthora infestans.* 150. Dublin, Irish Republic: Boole Press, 16-70.

Fernández, N. E., Navia, O., y Gandarilla, A. (1999). Bases de las estrategias de control químico de tizón tardío de la papa desarrollada por PROINPA en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la Papa* 11:1-25. Retrieved from https://www.papaslatinas.org/v11n1p1.pdf

Fernández-Pavía, S. P., Rodríguez-Alvarado, G., Garay-Serrano, E., Belmar-Díaz, C.R., Sturbaum A.K., Flier W y Lozoya-Saldaña, H. (2005). Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary provenientes de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:191-197. http://www.redalyc.org/pdf/612/61223213.pdf

Flier, W. G., and Turkensteen, L. J. (1999). Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. European *Journal of Plant Pathology.* 105: 381-388.

Flores, P., Lerdon, J., Bravo, H. R., y Acuña, I. (2008). Factibilidad de implementar pronosticadores automatizados para controlar el tizón tardío de la papa en el sur de Chile. AGRO SUR, V. 36(1): 1-8.

Fry E.W., and Goodwin S.B. (1995). Recent migrations of *Phytophthora infestans*. En: Dowley LJ, Bannon E, Cooke RL, Keane T, Andosullivan E, Editores, *Phytophthora infestans*. Dublin (Irlanda): Boole Press. 150:89-95.

Fry, W. E. (2008). Plant diseases that changed the world, *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. Molecular *Plant Pathology*. 9: 385-402. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x

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., Spielmnan, L. J., Deahl, K. L., Inglis, D. A., and Sandlan, K. P. (1993). Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans:* chronology, pathways, and implications. *Plant Dis*ease 77:653–661.

Fry, W. E., Grünwald, N.J., Cooke, D.E.L., Mcleod., A., Forbes, G.A., and Cao, K. (2009). Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. In: Lamour, K & Kamoun, S (Eds.) Oomycete Genetics and Genomics: Diversity, Interactions and Research Tolos.

Fry, W.E., and Goodwin, S.B. (1997). Resurgence of the Irish Potato Famine Fungus. *Bioscience* 47:363-371. Retrieved from https://academic.oup.com/bioscience/article-abstract/47/6/363/290456

Galindo, J. and Gallegly, M. E. (1960). The Nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology.* 50: 123-128. Retrieved from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19601602875

García, G. H., Marín, M., Jaramillo, S., y Cortes, J, M. (2008). Sensibilidad de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* a cuatro fungicidas. *Agronomía Colombiana* 26(1) 47-57. Retrieved from http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/

García, R.J., Correa, R.T., Gastelum, R.F., Orum, T.V.; Wasmann, C.C. and Nelson, M.R. (2000). Temporal and spatial patterns of genetic structure of *Phytophthora infestans* from tomato and potato in the del Fuerte Valley. *Phytopathology.* 90: 1188-1195. Doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.11.1188.

Gavino, P. D., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Miller, J. S., Ham, P. B., Lee, T. Y., Davis, R. M., and Fry, W. E. (2000). Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: Generation of and aggressive lineage*. Plant Disease*. 84: 731-735. Retrived from https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.7.731

Gómez, A. L., Carbone I. and Ristaino J.B. (2007). An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proc Nac. Acad. Sci.* 104:3306-3311. Doi: 10.1073/pnas.0611479104

Goodwin S.B. Spielmnan, L.J. Matuszak, J.M. Bergeron, S. N., And Fry W. E. (1992). Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* Population in Northern and Central Mexico*. Phytopathology* 82:955-961. Retrieved from http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n09_955.PDF

Goodwin SB. (1997). La genética de la población de *Phytophthora*. *Fitopatología.* 87 (4): 462-473. Doi: 10.1094 / PHYTO.1997.87.4.462.

Goodwin, S.B., Cohen, B.A. and Fry, W.E. (1994). Pangloblal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. Proceedings of theNational Academy of Sciences. 91: 11.591-11595.

Grünwald N., and Flier, W. G. (2005). The Biology of *Phytophthora infestans* at its Center of origin. *Annual Review of Phytopathology*. 43: 171-190. Doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.9.882.

Guadet J., Julien, J., and Francois, J. (1989). Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparision. Molecular *Biology Evolution* 6:227-242. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2622333

Hooker, W.J. (1980). Compendio de enfermedades de la papa. Nematodos parásitos de la papa. CIP. Lima. Perú. 131-134.

ISK-Biotech. (1990). Bravo. Daconil 12787. Broad Spectrum fungicide ISK-Biotech corporation. Ohio, USA.

Jaimasit, P. and W. Prakob. (2010). Characterization of *Phytophthora infestans* population in potato crops from Chiang Mai and Tak Provinces. *Journal of Agricultural Technology* 1: 117-125. Retrieved from http://www.ijat-aatsea.com/pdf/April_v7_n2_11/21%20IJAT2010_101%20FJ.pdf

Jaramillo, V. S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont De Bary. Universidad Nacional De Colombia. 138.

Judelson, H.S., Spielmnan, L.J., and Shattock, R.C. (1996). Genetic Mapping and Non-Mendelian Segregation of Mating Type Loci in the Oomycete *Phytophthora infestans. Genetics.* 141:503-512. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647388

Kamoun, S.; Haber, P.; Sobral, B.; Nuss, D. and Govers, F. 1999. Initial Assessment of gene diversity for the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* based on expressed sequences*. Fungal Genetics and Biology*. 28: 94-106. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10587472

Kato, M. E., Mizubuti, S., Goodwin, S. B., and Fry, E. (1997). Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal linages of *Phytophthora infestans* in the United States. *Phytopathology* 87: 973-980. Doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.9.973.

Koh, Y. J., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Cohen, B. A., Ogoshi, A., Sato, N., and Fry, W. E. (1994). Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries. *Phytopathology.* 84: 922-927. Doi: 10.1094/Phyto-84-922.

Leroux, P., Chabene, E., Bompeix, G. (1993). Selection and characterization of *Phytophthora parasitica* mutants with ultraviolet induced resistance to dimetomorph or metalxyl. *Pesticide Science* 39:325-329. Doi: 10.1002/ps.2780390413

Locher, P., and Lorentz, G. (1991). Methods for monitoring the sensitivity of *Botrytis cinerea* to ditiocarboximide fungicides. In: FRAC Methods For Monitoring Fungicide Resistence. EPPO Bulletin. 21: 341-345.

Lozoya-Saldaña, H., Guzmán-Galindo, L., Fernández-Pavía, S., Grünwald, N. L., and Mcelhinny, E. (2005). *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In: Host Pathogen Specificity and Resistance Components. *Agrociencia* 40: 205-217. Retrieved from http://aims.fao.org/serials/j_1294917173508

Lozoya-Saldaña, H., Robledo-Esqueda, M., Rivas-Valencia, P., Sandoval-Islas, S., Colinas-León, T.,and Navas-Díaz, C. (2017). Sensitivity to fungicides of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary in Chapingo, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(3): 2-10. Doi:http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.004.

Lozoya-Saldaña, H., and Hernández-Vilchis, A. (2001). Registered and section 18 compound for control of late blight (*Phytophthora infestans* Mont de Bary) in potatoes in Toluca, México. *Agrociencia* 35: 451-458.

Lucas, J.A., Shattock, R.C., Shaw D.S., And Cooke, L.R. (1991). *Phytophthora.* Cambridge University Press. 447.

Manríquez, R. (1995). Resistance of *Phytophthora infestans* strain to phenylamides in Spain. In Phytophthora infestans, European Association for Potato Research. Boole Press Ltd, Dublin, Ireland

Matson, M., Small, I., Fry, W., and Judelson, H. (2015). Metalxyl Resistance *Phytophthora infestans:* Assesing Role of RPA 190 Gene and Diversity Within Clonal Lineages*. Plant Pathology and Microbiology*. 105, 12: 1594-1600. Doi: 10.1094/PHYTO-05-15-0129-R

Matuszak, J. M., Fernández, E. J., Gu, W. K., Villareal, G. M., y Fry, E. (1994). Sensivity of *Phytophthora infestans* population to metalaxil in México; distribution and dynamics. *Plant Disease* 78: 911-916. DOI: 10.1094/PD-78-0911

Mercer, R.T. y Latorse, M. P. (2003). Fungicidal properties of the active ingredient fenamidone. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer 56, 465-476.

Neumann, C., (2012). Antecedentes generales de tizón tardío *(Phytophthora infestans)* en el cultivo de papa. Chile. *Boletín Informativo* 4: 1-5.

Niederhauser, J.S. (1991). *Phytophthora infestans:* The Mexican Connection In Lucas, J.A., R.C. Shattock, D.S., Shaw And L.R. Cooke. 1991 *Phytophthora Infestans*. Cambridge University Press. New Your 447.

Ordoñez, M. E., Hohl, H. R., Velasco, J.A., Ramón, M.P., Oyarzun, P. J., Smart, C. D., Fry, W. E., Forbes, G. A., and Erselius, L. J. (2000). A novel population of *Phytophthora,* similar to *P*. *infestans*, attacks wild Solanum species in Ecuador. *Phytopathology.* 90(2): 197-202. Doi. 10.1094/PHYTO.2000.90.2.197.

Pérez, W. y Forbes, G. (2008). Manual Técnico El Tizón Tardío De La Papa. Centro Internacional de la papa. Perú. 18-30.

Pérez, W. y Forbes, G. (2013). Manejo integrado del tizón tardío. Hoja de divulgación. Doi: ISBN 978-92-9060-320-7.

Randall, E., Young, V., Sierotzki, H., Scalliet, G., Birch, P., Cooke, D., Csukai, M, and Whisson, S. (2014). Sequence diversity in the large subunit of RNA polymerase I contribute to Mefenoxam insensitivity in *Phytophthora*

infestans. Molecular Plant Pathology. 15: 664-676. Doi: 10.1111/mpp.12124.

Raven P. H., Evert R. F. and Eichhom S. E. (1999). Biology of Plants. Six Edition New You. W H Freeman and Company. 944 Pp. 370.

Realpe, R. E. (2010). Evaluación de la eficiencia de fungicidas protectantes y sistémicos para el control de tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en el cultivo de papa en San Pedro de Huasca provincia del Carchis. Ibarra, Ecuador.

Rekanovi, E., Potoenik, I., Milijasevic, S., Stepanovic, M., Todorovic, B., and Mihajlovic, M. (2012). Toxicity of metalaxil, azoxistrobin, dimethomorph, cymoxanil, zoxamide and mancozeb to *Phytophthota infestans* isolates from Serbia. *Jourdan of Environmental Sciencie* and Hearth, Part B: pesticides, Food Contaminats, and Agricultural Waster, 47:5, 403-409. Doi: 10.1080/03601234.2012.657043.

Riethmüller A., Voglmayr H., Göker M., Weib M., and Oberwinkler F. (2002). Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 94:834-849. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156557

Rubio, C. O., Rangel, G. J., y Flores, L. J. (2000). Manual de la producción de papa en las sierras y valles altos del Centro de México. División Agrícola. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agricolas y Pecuarias (INIFAP) Centro de Investigación Regional del Centro. (edi) 1.

Runno, E., y Koppel, M., 2006. The question of metalaxil resistance on late bligth fungus in Estonia. *Agronomy Research* 4:341-344. Retrieved from http://agronomy.emu.ee/vol04Spec/p4S44.pdf

Runno, P. E., Fry, W. E., Remmel, T., Mänd, M., y Myers, K. L. (2010). Phenotypic and genotypic characterisation of estonian isolates of *Phytophthora*

infestans in 2004-2007. *Journal of Pathology*. 92(2): 375-384. Doi: http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v92i2.181

Saville, A., Graham, K., Grünwald, N. J., Myers, K., Fry, W. E., and Ristaino, J. B. (2015). Fungicide sensitivity of U. S. genotypes of *Phytophthora infestans* to six oomycete- targeted compounds. *Plant Disease..* 99: 659-666.

Schwinn, F, J., and Margot, P. (1991). Control with chemicals. *Phytophthora infestans* the cause of late blight potato. Advances in Plant Pathology. D. S. Ingram and P. H. Williams, (eds.) Academic Press, London. 225-265.

Shattock, R. C. (1988). Studies on the inheritance of resistance to metalaxil in *Phytophthora infestans. Plant Pathology.* 37: 4-11. Doi: 10.1111/j.1365-3059.1988.tb02188.x

Shaw, D.S., Fyfe, A.M., Hibberd, P.G. and Abdel-Sattar, M.A. (1985). Ocurrence of the Rare A2 Mating Type of *Phytophthora infestans* on imported Egyptian potatoes and the production of sexual Progeny with A1 mating types from the UK. *Plant Pathology*. 34: 552-556. Doi: 10.1111/j.1365-3059.1985.tb01406.x

Sozzi, D. F., Schwinn, J., and Gisi, U. (1992). Determination of the sensitivity of *Phytophthora infestans* tho phenylamides: A Leaf Dice Method EPPO- Bull. 22:306-9. Doi: 10.1111/j.1365-2338.1992.tb00499.x

Spielmnan L. J., Drenth, A., Davidse, L.C., Sujkowski, L. J., Gu, W., Tooley P.W. And Fry W.E. (1991). A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans. Plant Pathology* 40:422-430. **Doi:** 10.1111/j.1365-3059.1991.tb02400.x

Spielmnan L. J., Drenth, A., Davidse, L.C., Sujkowski, L. J., Gu, W., Tooley P.W. and Fry W.E. (1991). A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans. Plant Pathology* 40:422-430. **Doi:** 10.1111/j.1365-3059.1991.tb02400.x

Tooley P.W. and Fry W.E. (1991). A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans. Plant Pathology* 40:422-430.

Tooley, P. W., B. A. Bunyard, M. M. Carras, and E. Hatziloukas. (1997). Development of PCR Primers from Internal Transcribed Spacer Region 2 for Detection of Phytophthora Species Infecting Potatoes. Appl. Environ. *Microbiology* 63: 1467-1475.

Tooley, P. W., Therrien, C. D., and Ritch, D. L. (1989). Mating type, race composition, nuclear DNA content, and isoenzyme analysis of Peruvian isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 79:478-481.

Zhu, G. N. Huang, F. X., Feng, L. X., Quin, B. X., Yang, Y. H., Chen, Y. H., and lu, X.H. (2008). Sensitivities of *Phytophthora infestans* to Metalxyl, Cymoxanil, and Dimethomorph. *Science Directi*, 7(7):831-840. Retrieved from https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60120-0

Ziogas, B. N., Markoglow, A. N., Theodosiou, A., Anagnostou, A., and Boutopoulou, S. (2006). A high multi-drug resistance to chemically unrelated Oomycete fungicides in *Phytophthora infestans. European Journal of Plant Pathology.* 115:283-292. Doi: 10.1007/s10658-006-9007-6

CAPÍTULO 3

DIVERSIDAD GENÉTICA DE TIZÓN TARDÍO DE LA PAPA (*Phytophthora infestans* MONT. DE BARY) BAJO APLICACIÓN DE FUNGICIDAS EN METEPEC, EDO. MÉXICO.

GENETIC DIVERSITY OF POTATO LATE BLIGHT (*Phytophthora infestans* MONT. DE BARY) UNDER APPLICATION OF FUNGICIDES IN METEPEC, STATE OF MEXICO.

Eduardo Badillo-López[1], Héctor Lozoya-Saldaña[2*], Mercedes M. Cuenca-Condoy[3], Marcelo Acosta-Ramos[4], Sylvia P. Fernández-Pavía[5].

[1]Universidad Autónoma Chapingo. Instituto de Protección Vegetal. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C. P. 56230, México. [2]Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C. P. 56230, México.[3] Universidad Autónoma Chapingo. Instituto de Horticultura. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C. P. 56230, México.[4]Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitológica Agrícola. Carretera México-Texcoco Km 38.5. C. P. 56230, México.[5]Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigación Agropecuaria y Forestal, Km 9,5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarimbaro, Michoacán, México. C.P. 58880. *(Autor para correspondencia). picti87@gmail.com teléfono (595) 952-1500 ext 5224.

RESUMEN

El tizón tardío de la papa, cuyo agente causal es el Oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es la principal enfermedad de las Solanáceas. México es considerado como el centro de origen de dicho patógeno, siendo el Valle de Toluca el lugar donde presenta mayor diversidad genética, esto se debe en gran parte al uso irracional de fungicidas y a la presencia de grupos de compatibilidad. Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar aislamientos de *P. infestans* provenientes de parcelas con diversos fungicidas, en el municipio de Metepec, Edo. México. La caracterización se realizó en base a la identificación de grupos de compatibilidad, grado de resistencia a metalaxil *in vitro,* y caracterización molecular mediante la secuenciación de las regiones de ARN ribosomal ITS y RPA 190. Las proporciones de tipo de compatibilidad entre las poblaciones fueron, A1: 0.571, A2: 0.314 y A1/A2: 0.114. Se indentificaron dos aislamientos resistentes a dosis altas de metalaxil y uno con resistencia intermedia. Mediante la secuenciacion y elaboracion de dendogramas se formaron

Palabras clave: tipos de compatibilidad ITS; RPA 190; resistencia a metalaxil.

cinco grupos con caracteristicas similares, tanto de tipos de compatibilidad, nivel de resistencia a metalaxil y evaluación de fungicidas aplicados en campo, detectándose una gran diversidad genetica en las colectas.

GENERAL ABSTRACT

Potato late blight, caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Miont). De Bary, is the main disease of the Solanaceae. Mexico is considered the center of origin of this pathogen, with the Valley of Toluca being the place with the greatest genetic diversity, this is largely due to the irrational use of fungicides and the presence of compatibility groups. On the basis of this background, the objective of this work was to characterize *P. infestans* isolates obtained from plots sprayed with diverse fungicides in Metepec, State of México. The characterization was based on the identification of compatibility groups, degree of resistance to metalaxil in vitro, and molecular characterization by sequencing the ITS and RPA 190 ribosomal RNA regions. The proportions of compatibility type between populations were, A1: 0.571, A2: 0.314 and A1 / A2: 0.114. Two isolates resistant to a high dose of metalaxil and one with intermediate resistance were identified. Through the sequencing and elaboration of denograms, five groups with similar characteristics were formed, both types of compatibility, resistance level and metalaxil and evaluation of applications in the field, a great genetic diversity in the collections was detected.

Key words: compatibility types, ITS, RPA 190, metalaxil resistance.

3.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la papa es severamente limitado por la enfermedad conocida como tizón tardío o gota, causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, enfermedad que puede devastar en corto tiempo los campos cultivados, llegando incluso a provocar grandes catástrofes de carácter socioeconómico (López et al., 1997).

Diversos estudios sugieren que el origen de *P. infestans* es el valle de Toluca en México (Fry et al., 1993; Tooley, Bunyard, Carras y Hatziloukas,1997), corroborado esto por los hallazgos de diversos genes de resistencia al Oomycete, provenientes de especies silvestres de *Solanum* de dicha región (Niederhauser, 1991). Algunos argumentos más que fortalecen dichas suposiciones es la presencia de los dos tipos de apareamiento (A1 y A2), Belmar y Lozoya (2013), muestran consistentemente una gran diversidad genética en el Valle de Toluca, México, debido mayormente a su reproducción sexual. Aunado a esto los diversos sistemas de producción del valle de Toluca, pueden ejercer una selección en las poblaciones de *P. infestans,* así como, el uso intensivo de fungicidas juega un papel importante en la selección genética (Grünwald et al., 2001).

Actualmente existen diversos factores que incrementan la patogenicidad del Oomycete, destacando entre ellos la migración a nivel mundial de ambos tipos de apareamiento, implicando con ello un cruzamiento y combinación de genes, incrementando así la variabilidad genética, dando como consecuencia condiciones que dificultan el control del patógeno (Henfling, 1987).

Por tal motivo los estudios de este organismo se enfocan a su reproducción, fisiología y procesos infectivos, y es necesario conocer la diversidad genética de las poblaciones de las regiones infectadas, ya que están relacionadas con la eficiencia y eficacia de los métodos de control (Alarcón-Rodríguez et al. 2013).

Diversas son las metodologías empleadas para la caracterización de *P. infestans*, empleando en ello marcadores fenotípicos y genotípicos, siendo los más utilizados los patrones aloenzimaticos de glucosa fosfato isomerasa (GPI) y peptidasas (Pep) (Goodwin, Schneider y Fry,1995), así como tipo de apareamiento y los niveles de

resistencia a metalaxil, sin embargo, dichas características no permiten tener una caracterización sólida, es por ello que actualmente es empleada la biología molecular, secuenciado genes que permiten conocer el comportamiento del patógeno a nivel de DNA, teniendo como base la región ITS (Internal Transcribe Space y/o Espaciador Transcrito Interno), que permite clasificar genotipos de diferentes especies de un mismo género, o más particular la región RPA 190 (Replication Protein A y/o Proteína de Replicación A) ligada a la característica de resistencia a fungicidas en *P. infestans* (Daayf, Platt, Mahuku y Peters, 2001; Goodwin y Fry, 1995; Gómez, Carbone y Ristaino, 2007; Jaimasit y Prakob, 2010; Matson, Small, Fry y Judelson, 2015; Randall et al., 2014; Spielmnan et al. 1991).

El conocimiento de la sensibilidad de los aislamientos de *P. infestans* a los fungicidas con diferentes modos de acción es muy importante para el desarrollo de estrategias de manejo de la enfermedad (Rekanovi et al., 2012). Sin embargo, diversos estudios muestran que la aplicación continua de fungicidas con el mismo ingrediente activo o del mismo mecanismo de acción, ejercen una alta presión de selección sobre los patógenos, lo que provoca la disminución en la efectividad de estos productos al control del patógeno, dando como resultado una gradual resistencia en las poblaciones de *P. infestans* (García, Marín, Jaramillo y Cortes, 2008; Rekanovi et al. 2012).

Se ha demostrado que la presencia de mutaciones puntuales en los genes que codifican para las proteínas blanco de la acción fungicida y de ciertas secuencias de nucleótidos, ubicadas en las regiones promotoras de dichos genes, se encuentran asociadas con la ocurrencia de varios fitopatógenos con genotipos resistentes a diversas moléculas químicas. La frecuencia de apariciones de dichos cambios genéticos está directamente asociada con la tasa de recombinación en los ciclos sexuales y parasexuales que presentan los hongos y Oomycetes (Damicone, 2004; García et al., 2008).

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fuer caracterizar los grupos de compatibilidad de los aislamientos sometidos a fungicidas en campo, determinar *in vitro* la resistencia de dichos aislamientos a metalaxil y caracterizar mediante la secuenciación de las regiones de RNA ribosomal ITS y RPA 190 de los genotipos de estudio. Bajo la hipótesis de que los fungicidas ejercen una presión de selección que conduce a una

mayor variabilidad y resistencia a fungicidas de las progenies del Oomycete sobreviviente.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Localización del experimento.

Los aislamientos utilizados se colectaron de plantas establecidas en ensayos de campo en el municipio de Metepec, Estado de México, se evaluaron diversos fungicidas (cuadro 1), la frecuencia de las aplicaciones fue cada siete días después de la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, la toma de muestras se realizó 15 días después de la primera aplicación de fungicidas, y se colectaron hojas con síntomas cada 15 días hasta que terminó el ciclo del cultivo.

3.2.2. Aislamiento del patógeno

En el laboratorio se desinfestaron las muestras con una solución de Hipoclorito de sodio al 3% (v/v) durante cinco minutos y se colocaron sobre cámaras húmedas con el objetivo de brindar las condiciones adecuadas para la formación de esporangios. Después de 24 horas, se colocaron rodajas de papa (de 3 a 5 mm de grosor, previamente desinfestadas con hipoclorito de sodio al 20% (v/v)) durante 10 min) sobre la hoja con el síntoma, con la finalidad de usar la papa como un filtro y permitir el crecimiento micelial.

Al tercer día se eliminaron las hojas, se dejaron las rodajas de papa en las cámaras húmedas, después de 36 horas aproximadamente, con una aguja de disección se transfirió el micelio que creció sobre la rodaja de papa a medio agar centeno (Caten y Jinks, 1968) siguiendo la metodología descrita por Garay-Serrano (2005), con una modificación (previo al vaciado del medio de cultivo, se agregaron 0.3 g del fungicida Benomyl y 0.2 g de Oxitetraciclina para evitar el crecimiento de hongos y bacterias), posteriormente se incubaron en oscuridad a 17°C. Una vez purificados los aislamientos se transfirieron a medio sólido agar-centeno para las siguientes evaluaciones.

Cuadro 1. Fungicidas aplicados en campo de acuerdo a los aislamientos obtenidos.

Aislamiento	Nombre del producto	Ingrediente activo	Dosis (gr ia·h^{-1})
T11	Krity MZ	Cymoxanil+ Mancozeb	180+1280
T12	Ranman	Ciazofamida	120
T13	Ranman + Cymoxanil	Ciazofamida + Cymoxanil	60+120
T14	Ranman + Cymoxanil	Ciazofamida + Cymoxanil	70+120
T15	Ranman + Cymoxanil	Ciazofamida + Cymoxanil	80+120
T16	Ranman + Pistop	Ciazofamida + Propamocarb	60+722
T17	Ranman + Rolling	Ciazofamida + Clorotalonil	60+1080
T18	Ranman + Flonex Mz400	Ciazofamida + Mancozeb	60+1000
T19	Ranman + Rolling	Ciazofamida + Clorotalonil	80+1080
T110	Ranman + Flonex Mz400	Ciazofamida + Mancozeb	80+1000
T112	Testigo		
T41	Testigo		
T42	Ranman	Ciazofamida	100
T43	Ranman + Suprila	Ciazofamida + Cymoxanil	80+100
T44	Proxanil	Propamocarb + Cymoxanil	800+100
T45	Proxanil	Propamocarb + Cymoxanil	1000+120
T46	Ranman + Pistop	Ciazofamida + Propamocarb	80+722
T48	Concento	Propamocar + Fenamidona	750+150
T52	Ranman	Ciazofamida	100
T53	Ranman + Pistop	Ciazofamida + Propamocarb	80+722
T54	Ranman + Cymoxanil	Ciazofamida + Cymoxanil	80+150
T56	Diprospero	Propamocarb + Dimetomorf	1250+225
T57	Diprospero	Propamocarb + Dimetomorf	1250+225
T58	Acrobat CT	Dimetomorf + Clorotalonil	250+1250
T59	Concento	Propamocarb + Fenamidona	750+150
T510	Revus	Mandipromamida	300
T61	Testigo		
T62	Ranman	Ciazofamida	100
T64	Proxanil	Propamocarb + Cymoxanil	900+100
T65	Proxanil + Ranman	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	600+75+60
T66	Proxanil + Ranman	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	600+75+80
T68	Proxanil + Ranman	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	800+100+60
T69	Proxanil + Ranman	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	800+100+80
T610	Proxanil + Ranman	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	800+100+100
T611	Infinito	Flupicolide + Propamocarb	93.75+937.5

3.2.3. Tipos de compatibilidad de *Phytophthora infestans*

Se realizaron cruzamientos con las cepas de tipo de compatibilidad conocido (A1 y A2); cada aislamiento se cultivó en medio agar centeno en un extremo de la caja Petri (60 mm de diámetro), en la misma caja en el lado opuesto se colocó la cepa tipo, y se incubaron de 2 a 3 semanas a temperatura de 20°C, el entrecruzamiento de micelio y la presencia de oosporas indicó que el aislamiento desconocido pertenecía al grupo de compatibilidad opuesto al del enfrentamiento, arrojando diferentes clasificaciones A1 o A2 cuando el crecimiento fue opuesto a la cepa tipo, homotálico (H) cuando el aislamiento de interés presentó formación de oosporas en ambos enfrentamientos y estériles (E) cuando en ambos enfrentamientos no hubo desarrollo de estructuras de reproducción.

3.2.4. Resistencia *in vitro* de *Phytophthora infestans* a metalaxil

Para determinar los niveles de resistencia de los aislamientos al metalaxil, se realizaron ensayos de resistencia *in vitro*, utilizando la metodología descrita por Shattock (1988) y Deahl y Demuth (1995).

Se incubaron los aislamientos en medio selectivo agar- centeno, adicionado de micro concentraciones de metalaxil a diferentes dosis (10, 50, 100 $mg \cdot L^{-1}$ y la dosis comercial). Como variable respuesta se midió el crecimiento micelial de cada prueba 10 días después del establecimiento (esto debido a que registros de fabricantes determinan que los fungicidas empiezan a perder su efectividad después de los 10 días de su aplicación), y empleado la siguiente fórmula:

$$PC = \frac{DMCM - 5mm}{DMCA - 5mm} X\ 100$$

Dónde: PC: Porcentaje de Crecimiento; DMCM: Diámetro Medio Colonial; 5 mm: Diámetro del cilindro con micelio sembrado originalmente al centro de la caja Petri; DMCA: Diámetro del crecimiento del testigo sin fungicida.

Para determinar los niveles de resistencia a metalaxil de cada aislamiento, se utilizaron los siguientes criterios: resistente si el PC fue mayor o igual a 60, intermedio si el PC estuvo entre 10 y 60 y susceptible si el PC fue menor o igual a 10 (Deahl, Demuth, Sindel

y Rivera, 1995b; Shattock, 1998). Se calculó para cada uno de los aislamientos obtenidos la concentración efectiva media (CE_{50}), variable que se determina como la concentración media de un fungicida (en este caso metalaxil) necesaria para inhibir el 50% del crecimiento de micelio en medio *in vitro* de los aislamientos de interés. La CE_{50} se determinó mediante un modelo Probit con el programa SAS (por sus siglas en inglés Statistical Analysis System) v.v 9.0, utilizando datos de crecimiento de los aislamientos a las cuatro concentraciones de metalaxil comparado con los testigos.

3.2.5. Extracción de ADN de *Phytophthora infestans*

Se empleó el método de extracción CTAB (del inglés Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) propuesto por Murray y Thompson en 1980. Este método consistió en tomar micelio de 20 días de crecimiento de cada una de las cajas Petri y con la ayuda de una navaja de rasurar se depositó en un mortero y se maceró utilizando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Con una espátula se transfirió el polvo a un microtubo con 600 µl de amortiguador de extracción y se agregaron 10 µl de proteínas K (Tritiranchium Alcalin Proteinasa de la empresa SIGMA_ALDRICH, Paque Industrial Toluca, México) para romper las paredes celulares, despues se precalentó y se mezcló. Posteriormente se incubó en el thermoblock (Eppendorf™ 5309000333) a 65°C durante 20 minutos.

Enseguida se adicionaron 200 µl de acetato de potasio, se agitó manualmente y se dejó durante 30 minutos en hielo, se centrifugó a 21,000 xg, durante 10 minutos, y se transfirió a un nuevo microtubo de 1.5 ml, se agregó cloroformo: Alcohol isoamilico (24:1) y se agitó por 2 minutos. Luego se centrifugó a 12,000 xg durante 5 minutos, separando la fase acuosa (superior) en otro microtubo y se agregaron 500 µl de isosopropanol frío, la mezcla se agitó por inversión suavemente, hasta que se obtuvo un precipitado (ácidos nucleicos), este precipitado se incubó a -20° C durante 30 minutos, se centrifugó a 12,000 xg durante 5 min, y se decantó el sobrenadante, se adicionaron 700 µl de STE (Sodio Tris Edta y/o Bromuro de Cetiltrimetilamonio) y se mantuvo por 24 horas a 4°C con el objetivo de disolver los ácidos nucleicos.

Se agitó por inmersión para disolver los ácidos nucleicos, se agregaron 4 µl de RNasa para eliminar el ARN, se mezcló y se mantuvo por 1 h a 37°C, se adicionaron 70 µl de

acetato de sodio 3 M y 700 µl de isopropanol frío, se agitó hasta obtener el precipitado de ADN y se dejó reposar durante 30 min a -20°C, se centrifugó a 8,000 xg durante 10 min y se decantó, agregándole posteriormente 500 µl de etanol al 70% (grado reactivo), se agitó para disolver las sales y se centrifugó a 8,000 xg durante 10 minutos, por último se decantó, se dejó secar sobre una toalla y finalmente se adicionaron 100 µl de TE y se guardó a 4°C.

Posterior a la extracción de DNA mediante el uso del NanoDrop^{TM} 2000 se midió la cantidad de DNA y la pureza del mismo obtenido por muestra, siendo algunas lecturas bajas, se optó por hacer una amplificación de la región 16s, para asegurar la presencia de DNA por muestra. La mezcla de reacción fue: dNTP´s 200 µM, MgCl2 2.75 mM, 10 picomoles de cada iniciador, Amortiguador de PCR 1x, Go Taq DNA Polimerasa 1U (promea), DNA 50 ng teniendo un volumen final de 25 µl; El programa PRC que se utilizó fue, un ciclo a 94°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos conformados por 94°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 1 min, con una extensión final de 72°C por 6 min.

Al finalizar el programa PCR, las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa a 1.2% (p/v) previamente elaborado, colocándolo en la cámara adicionándole amortiguador de corrida Tris-HCL-ácido bórico-EDTA (TAE), agregando 7 µl de cada muestra, se corrió a 110 v durante 45 min. Al finalizar el tiempo se tiñó con bromuro de etidio y se reveló mediante rayos x.

3.2.6. Amplificación de las regiones ITS y RPA 190 de *Phytophthora infestans*

Las extracciones de DNA de cada aislamiento fueron enviadas a Macrogen (Corea del Sur), secuenciado las regiones ITS4 a ITS5, y la región RPA 190.

Para la amplificación de las regiones ITS4 y ITS5, se usaron los iniciadores descritos por Cooke, Drenth, Dunca, Wagels y Bresler (2000): ITS4 5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´e ITS5 5´-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3´, los cuales permiten obtener fragmentos de 900 pb en Oomycetes. Para la región RPA 190 se utilizó los iniciadores G1 5´-GGCGCAAATTCTTCCTGAAC-3´ y G1B 5´TTGCTGCTATCCACCAGAAG-3, el cual permiten la amplificación de un fragmento de 711 pb (Matson et al, 2015). Los volúmenes utilizados para la PCR fueron: dNTP´s 200 µM, MgCl2 2.75 mM, 10 picomoles

de cada iniciador, Amortiguador de PCR 1x, Go Taq DNA Polimerasa 1U (promea), DNA 50 ng teniendo un volumen final de 25 µL; El programa de PCR consistió en un ciclo a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos conformados por 94°C 30 s, 55°C 1 minuto, 72°C 1 minuto, con una extensión final de 72°C por 6 min.

3.2.7. Análisis de Secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de las dos regiones de, se compararon en el GenBank utilizando el programa BLAST, se utilizó el software MEGA7 para el análisis filogenético mediante el método "*neighbour Joining*" (unión de vecinos), se incluyó una secuencia de *Phytophthora capsici* obtenida del GenBank, usada como punto de comparación. Se elaboró un dendograma por cada una de las regiones secuenciadas y uno consolidado por ambas regiones secuenciadas.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.1. Aislamiento del patógeno.

Se obtuvieron 35 aislamientos de los diferentes experimentos establecidos en campo, corroborados morfológicamente como *P. infestans* Jaramillo (2003), Pérez y Fobes (2008) y Jaimasit y Prakob (2010).

3.3.2. Tipos de apareamiento de *Phytophthora infestans*

Las pruebas realizadas revelaron la presencia de los dos tipos de compatibilidad de *P. infestans* (Cuadro 2), con las siguientes frecuencias, A1 = 0.571, A2 = 0.314 sin guardar la proporción de 1:1. Se identificaron algunos aislamientos homotálicos (A1/A2) con una frecuencia de 0.114. Los resultados difieren con lo reportado por Grünwald et al., (2001) y Gómez et al., (2007), quienes encontraron que en el Valle de Toluca los tipos A1 y A2 presentaban una proporción 1:1, y sin reportar evidencias de aislamientos homotálicos.

Las poblaciones homotálicas tienen una proporción baja, existen ligeros cambios en las poblaciones en relación a su tipo de apareamiento, alejándose de la proporción descrita por otros autores, un ligero desplazamiento de las poblaciones heterotálicas por las homotálicas, relevante para posteriores estudios, ya que este tipo de poblaciones

(homotálicos) presentan como características alta capacidad de virulencia y viabilidad, características que le permiten una mayor adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Silva, Jaramillo y Marín, 2009). Estudios realizado por Alarcón-Rodríguez et al., (2013), en los campos experimentales de la Universidad Autónoma Chapingo, determinaron una frecuencia de 0.761 para homotálicos en relación a los aislamientos heterotálicos, así mismo hace mención que dichas condiciones homotálicas pueden proveer una ventaja selectiva en poblaciones recientes y futuras, ya que éstas pueden iniciar la reproducción sexual por si mismas; a su vez se presenta una alta endogamia, ya que se reducen la heterocigosidad a la mitad en cada generación, teniendo a largo plazo una ventaja para control de dichas poblaciones.

Diversos estudios atribuyen a los fungicidas el ser los causantes de mutaciones en poblaciones de *P. infestans*, en 1994 Koh et al., encontraron la existencia de ambos tipos de apareamiento en Japón desde 1937, antes de la difusión del tipo A2, sugiere que esto pudo deberse en una autocorrección del tipo A1 a la forma A2, inducida por un envejecimiento, exposición a fungicidas o diferentes tipos de estreses existentes. Calderón, Castro, Gilchrist, Márquez y Jaramillo (2002) sostienen que el incremento de la frecuencia del tipo A2 podría deberse a una mayor tolerancia a fungicidas como el metalaxil y una mejor adaptación a estreses provocados por condiciones climáticas adversas. Por otro lado, el cultivo continuo de variedades de papa con genes mayores ha podido contribuir a la selección de razas más agresivas del patógeno (Fry, 2008; Runno y Koppel, 2006), esto fue demostrado por Flier y Turkensteen (1999) y Gavino et al., (2000), quienes identificaron en el continente europeo, nuevos aislamientos más complejos y resistentes a fungicidas que poseían un periodo de latencia más reducido.

3.3.3. Evaluación *in vitro* de resistencia a metalaxil *de Phytophthora infestans*

El mayor porcentaje de aislamientos resistentes a metalaxil en la prueba *in vitro* corresponden a los expuestos a 10 $mg \cdot L^{-1}$ con un 34% de los genotipos que fueron sometidos a aplicaciones del fungicida Cyazofamida (solo o en combinación) (cuadro 2), Lozoya-Saldaña et al., (2017) encontraron en el 2011 un porcentaje del 51.42% de las poblaciones resistentes a la misma dosis de metalaxil, no obstante, en pruebas

posteriores realizadas por los mismos autores (en el 2012) el nivel de resistencia aumentó al 100% de los aislamientos evaluados a dicho fungicida.

Al exponer a los aislamientos obtenidos a 100 $mg \cdot L^{-1}$ de metalaxil, el 55% presentaron susceptibilidad al fungicida, mientras que el 44 % restante de la población para esta dosis se clasifican como intermedios. Estos resultados difieren con los de Lozoya-Saldaña et al., (2017), quien el 2011 el 94% de los aislamientos evaluados fueron susceptibles y en el 2012 el 100% lo fue. Páez, Valverde, Gómez y Brenes (2001) y Gissi y Cohen (2002), reportaron niveles de resistencia entre 40 y 60% al fungicida metalaxil y determinan que esto se debe en gran medida a la presencia de ambos tipos de apareamiento (A1 y A2), así como a la presión selectiva que se ejerce cuando solo se utiliza el control químico,

Para la dosis comercial (3600 $mg \cdot L^{-1}$) se detectaron dos aislamientos resistentes, estos pertenecen a la exposición a los fungicidas Propamocarb + Dimetomorf (T57) y mandipromida (T510). Así mismo, se obtuvo un aislamiento de resistencia intermedia (T611) sometido a la mezcla de Flupicolide + Propamocarb. Esos tres aislamientos comparten la característica de tener tipo de apareamiento homotálico, aunque no se tienen reportes que determinen alguna asociación entre fungicidas y el tipo de compatibilidad homotálico, Groves y Ristaino (2000), mencionan que la producción masiva de oósporas podría ligarse al uso intensivo de fungicidas en la compatibilidad heterotálico. Algunos reportes como los realizados por Fernández-Pavía et al., (2005), afirman que la presencia de aislamientos homotálicos podría estar relacionado con las aplicaciones de metalaxil.

En una segunda etapa, utilizando los datos obtenidos de la prueba de resistencia a metalaxil y mediante el uso del software estadístico SAS (por sus siglas en inglés Statistical Analysis System) v.v 9.0, se elaboró un análisis probit para determinar la concentración letal media (CL_{50}) con un límite de confianza de 95%.

Al realizar una prueba probit para un grupo de organismos, se busca utilizar un organismo de la misma especie que presenta sensibilidad a las sustancias evaluadas (testigo), con el objetivo de tener valores de comparación, para nuestro ensayo al no contar con un testigo. Se siguió la metodología empleada por Gamez y Ramírez (2008), en pruebas

realizadas con herbicidas sobre *Daphnia magna*, los cuales utilizaron el promedio de las CL_{50} y de los límites fiduciales (inferior y superior), y compararon el promedio con las CL_{50} obtenidas, consideran como susceptibles a los aislamientos con CL_{50} menor al promedio y resistentes a CL_{50} mayores al promedio. El resultado obtenido para esta prueba mostró que la mayoría de los aislamientos son susceptibles, ubicándolos dentro de los limites calculados y oscilando dentro de los mismos rangos (Cuadro 3).

Para los 35 aislamientos evaluados la CL_{50} promedio fue de 1.2175 $mg \cdot L^{-1}$, de los cuales el 63% de los aislamientos muestra sensibilidad a metalaxil, en los rangos de 0.9660 $mg \cdot L^{-1}$ como límite inferior y 1.5711 $mg \cdot L^{-1}$ como límite superior. Dichos resultados coinciden con los trabajos de Shattock (1998), Deahl y Demuth (1995). Sin embargo, el 31% de los aislamientos restantes, quedan fuera del límite fiduncial superior, indicando niveles de resistencia dosis menores a 100 $mg \cdot L^{-1}$. Investigaciones realizadas por Riveros, Sotomayor, Rivera, Secor y Espinoza en 2003 sobre aislamientos de *P. infestans* en el cultivo de papa al Norte de Chile, hallaron genotipos con resistencia a 100 $mg \cdot L^{-1}$ de metalaxil, haciendo evaluaciones con dosis más altas, los resultados que obtuvieron demostraron que el 100% de los aislamientos (58 aislamientos) presentaron una CL_{50} entre 243 y 687 $mg \cdot L^{-1}$. Dichos resultados son similares a los obtenidos en este experimento, donde tres aislamientos mostraron resistencia a la dosis de 3600 $mg \cdot L^{-1}$, pudiéndose deber esto a la selección ejercida por los fungicidas aplicados en campo, de donde se obtuvieron dichos aislamientos.

Sin embargo, a nivel de campo se busca obtener los mejores porcentajes de control o en este caso de inhibición de crecimiento de *P. infestans* cercanos al 100 %, por lo cual al realizar pruebas probit, las Concentraciones Efectivas de 95% (CL_{95}) son las de mayor interés (Cuadro 3).

Siguiendo la misma metodología de Gámez y Ramírez (2008), con una CL_{95} de 4.9225 $mg \cdot L^{-1}$ de promedio, con límites fiduciales entre 4.0367 y 13.9038, el 60% de los aislamientos mostraron susceptibilidad a metalaxil, dichos resultados coinciden con los obtenidos en 2003 por Riveros et al., quienes emplear dosis de metalaxil superiores a 200 $mg \cdot L^{-1}$.

3.3.4. Extracción de DNA

Los resultados obtenidos en la electroforesis evidenciaron la presencia de DNA en todas las muestras, observándose en el gel de agarosa la amplificación de la región 16s.

3.3.5. Secuenciación y Análisis de secuencias

Las secuencias derivadas del fragmento de la región ITS muestra un rango del 97 a 100 % de compatibilidad con *P. infestans* reportada en el GenBank con la serie KC677788.1 reportado por Chowdappa et al., en 2013, en trabajos realizados en la India. Realizando el agrupamiento de estas secuencias de los aislamientos de estudio y comparándolas con una secuencia de *P. capsici*, se observó que todos se agruparon fuera del grupo *P. capsici,* permitiendo corroborar que se trató de la especie de *P. infestans.* Internamente el agrupamiento de los genotipos, se da en tres grupos (Figura 4).

El grupo 1 está conformado por los aislamientos T65, T41, T19 y T11, estos genotipos tienen la particularidad de que comparten dentro de los tratamientos en campo el mismo fungicida (Cimoxanil) y una proporción en el grupo de compatibilidad de A1 con un 50%. El grupo 2 conformado por los genotipos T58, T112, T62, T56, T46 y T42, se caracterizan por haber estado sometidos a aplicaciones de Cyazofamida, Dimetomorf y Propamocarb, así mismo una relación del grupo de compatibilidad A1/A2 de 1:1. En el grupo 3, se agrupan la mayor cantidad de aislamientos: T17, T44, T54, T59, T110, T18 y T16, de los cuales el tipo A2 representa un 71.4% de los genotipos, y tienen en común aplicaciones de Cyazofamida y Propamocarb (i.a.). Por último, los aislamientos restantes conformaron grupos donde no se observaron diferencias.

Al amplificar la región RPA 190 se obtuvo el 99% de similitud con *P. infestans* T30-4, cuya serie en el GenBank es XM_002906849.1, descrita por Nusbaum et al., en el 2010. De acuerdo al análisis filogenético con dichas secuencias se observó formación de cinco grupos (figura 5), que comparten características en función a las pruebas realizadas en laboratorio (grupo de compatibilidad resistencia a metalaxil) y a los fungicidas evaluados en campo, de donde se extrajeron dichos aislamientos.

El grupo 1 conformado por los aislamientos T17, T57, T58, T66, T42 y T54 coinciden en un 83.3% con el tipo A1, y comparten la aplicación en campo de Cyazofamida, Dimetomorf y Propamocarb. En el grupo 2 se encuentran los aislamientos T68, T13, T19 y T52, donde se realizaron aplicaciones de Cyazofamida, teniendo un 50% de asilamientos tipo A1. El grupo 3 lo conforman los aislamientos T18, T61, T62, T64, T11, T46, T59, y T16, teniendo como característica en común la aplicación de Cyazofamida y Propamocarb, además el grupo de compatibilidad A2 lo presentan seis de los ocho aislamientos de este grupo. El grupo 4 comparte como fungicida común al Propamocarb y se encontró en mayor frecuencia el tipo A2 dentro de los aislados T48, T611, T41, T53, T56 y T65. Por último, en el grupo 5 se encuentran los aislados T43, T510, T44, T110, T610, T14 y T69 y tienen como común aplicaciones de Cyazofamida, Cimoxanil y Propamocarb, presentando con mayor frecuencia el grupo de compatibilidad el tipo A1.

Finalmente, el dendograma elaborado con los datos de ambas regiones secuenciadas (Figura 6), los resultados arrojados coinciden con los agrupamientos del dendograma de la región RPA 190, teniendo algunas modificaciones en los grupos 3 y 5 donde se excluyen 1 y 3 aislamientos respectivamente, aunado a esto, la posición de dichos grupos cambia a los elaborados con la región RPA 190, sin embargo, los conforman los mismos genotipos.

CUADRO 2. Tipos de compatibilidad y categoría de resistencia a metalaxil de los genotipos colectados en Metepec, Edo. México

Aislamiento	Ingrediente activo	Compatibilidad	Dosis ($mg \cdot L^{-1}$)			
			10	50	100	3600
T11	Cymoxanil+ Mancozeb	A1	I	S	S	S
T12	Ciazofamida	A1	I	S	S	S
T13	Ciazofamida + Cymoxanil	A2	I	I	S	S
T14	Ciazofamida + Cymoxanil	A1	R	I	I	S
T15	Ciazofamida + Cymoxanil	A2	R	I	I	S
T16	Ciazofamida + Propamocarb	A2	R	I	S	S
T17	Ciazofamida + Clorotalonil	A1	I	S	S	S
T18	Ciazofamida + Mancozeb	A2	S	S	S	S
T19	Ciazofamida + Clorotalonil	H	R	R	I	S
T110	Ciazofamida + Mancozeb	A2	R	S	S	S
T112	Testigo	A2	S	S	S	S
T41	Testigo	A1	I	I	S	S
T42	Ciazofamida	A1	R	I	I	S
T43	Ciazofamida + Cymoxanil	A1	S	S	S	S
T44	Propamocarb + Cymoxanil	A2	I	I	S	S
T45	Propamocarb + Cymoxanil	A1	R	I	I	S
T46	Ciazofamida + Propamocarb	A2	I	S	S	S
T48	Propamocar + Fenamidona	A2	I	S	S	S
T52	Ciazofamida	A1	S	S	S	S
T53	Ciazofamida + Propamocarb	A2	R	R	I	S
T54	Ciazofamida + Cymoxanil	A1	I	I	S	S
T56	Propamocarb + Dimetomorf	A2	R	R	I	S
T57	Propamocarb + Dimetomorf	H	R	R	R	R
T58	Dimetomorf + Clorotalonil	A1	S	S	S	S
T59	Propamocarb + Fenamidona	A2	I	I	S	S
T510	Mandipromamida	H	R	R	R	R
T61	Testigo	A2	S	S	S	S
T62	Ciazofamida	A1	R	I	I	S
T64	Propamocarb + Cymoxanil	A1	I	S	S	S
T65	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	A2	R	I	I	S
T66	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	A1	I	I	I	S
T68	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	A1	R	I	I	S
T69	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	A1	R	I	I	S
T610	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	A1	I	I	I	S
T611	Flupicolide + Propamocarb	H	R	I	I	I

CUADRO 3. Concentraciones Letales 50 y 95 (CL_{50} y CL_{95}) de los aislamientos de *P. infestans* de los aislamientos colectados en colectados en Metepec, Edo. México.

Aislamiento	Ingrediente activo	DL_{50}	Limites		DL_{95}	Limites	
			Inf.	Sup.		Inf.	Sup.
T11	Cymoxanil+ Mancozeb	0.000	-	-	1.110	-	-
T18	Ciazofamida + Mancozeb	0.000	-	-	0.000	-	-
T58	Dimetomorf + Clorotalonil	0.000	-	-	0.000	-	-
T61	Testigo	0.000	-	-	0.000	-	-
T52	Ciazofamida	0.000	-	-	0.000	-	-
T43	Ciazofamida + Cymoxanil	0.123	0.001	0.338	1.136	-	-
T44	Propamocarb + Cymoxanil	0.544	0.368	0.697	0.811	0.230	1.133
T16	Ciazofamida + Propamocarb	0.574	0.334	0.762	2.725	2.320	3.430
T110	Ciazofamida + Mancozeb	0.673	0.269	0.959	2.138	1.796	2.812
T59	Propamocarb + Fenamidona	0.676	0.402	0.895	2.815	2.141	5.220
T12	Ciazofamida	0.740	0.618	0.836	3.282	2.630	4.822
T69	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	0.749	0.282	1.091	1.727	1.559	1.994
T112	Testigo	0.796	-	-	5.751	3.789	17.467
T64	Propamocarb + Cymoxanil	0.856	0.281	1.253	0.935	-	-
T17	Ciazofamida + Clorotalonil	0.904	-	-	6.717	4.097	32.213
T48	Propamocar + Fenamidona	0.929	-	-	1.088	-	-
T54	Ciazofamida + Cymoxanil	0.947	0.677	1.153	1.112	-	-
T66	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	0.956	-	-	2.891	2.348	4.154
T42	Ciazofamida	0.957	0.721	1.145	5.830	4.433	9.631
T46	Ciazofamida + Propamocarb	1.004	-	-	2.596	2.114	3.698
T41	Testigo	1.058	0.814	1.259	1.179	-	-
T13	Ciazofamida + Cymoxanil	1.121	0.878	1.325	4.253	3.419	6.052
T14	Ciazofamida + Cymoxanil	1.286	1.049	1.490	4.504	3.608	6.441
T68	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	1.527	1.147	1.851	4.107	3.351	5.663
T15	Ciazofamida + Cymoxanil	1.683	1.239	2.080	6.249	4.421	12.721
T610	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	1.740	1.450	2.017	6.916	4.643	17.311
T56	Propamocarb + Dimetomorf	1.894	1.400	2.396	5.099	3.982	7.828
T45	Propamocarb + Cymoxanil	1.900	1.559	2.244	7.596	4.876	23.438
T62	Ciazofamida	1.936	1.663	2.211	5.975	4.437	10.527
T65	Propamocarb + Cymoxanil + Ciazofamida	1.983	1.582	2.406	5.199	4.151	7.564
T19	Ciazofamida + Clorotalonil	2.018	1.628	2.435	6.554	4.624	13.746
T53	Ciazofamida + Propamocarb	2.043	1.717	2.387	6.346	4.548	12.667
T611	Flupicolide + Propamocarb	-	-	-	-	-	-
T510	Mandipromamida	-	-	-	-	-	-
T57	Propamocarb + Dimetomorf	-	-	-	-	-	-
	PROMEDIO DE CONCENTRACION EFECTIVA	1.217	0.966	1.571	3.809	3.342	9.569

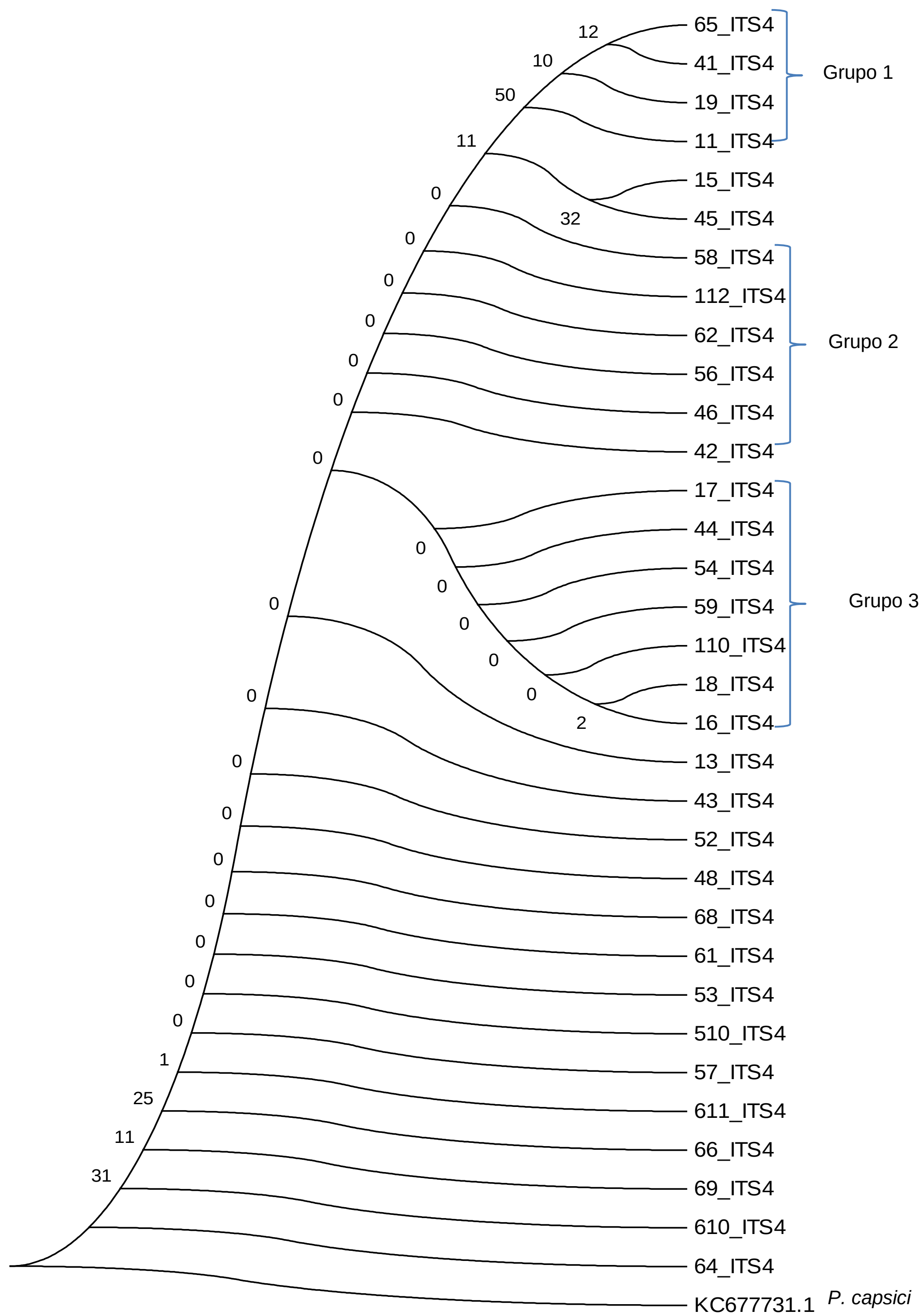

Figura 4. Dendograma construido con el utilizando el coeficiente de similitud de junta de vecinos y las secuencias ITS de los genotipos identificados en Metepec, Méx.

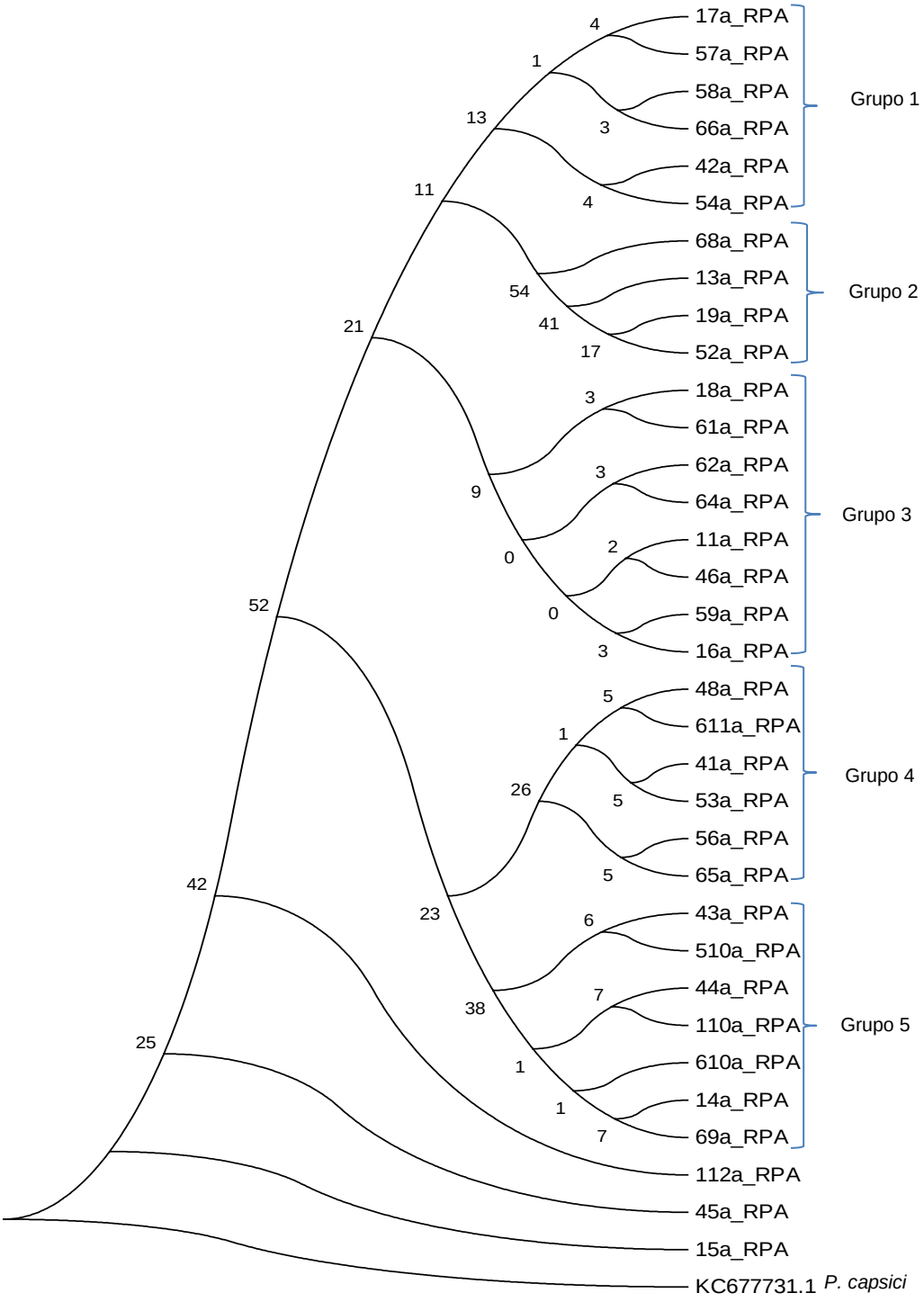

Figura 5. Dendograma construido con el utilizando el coeficiente de similitud de junta de vecinos y las secuencias RPA 190 de los genotipos identificados en Metepec, Méx.

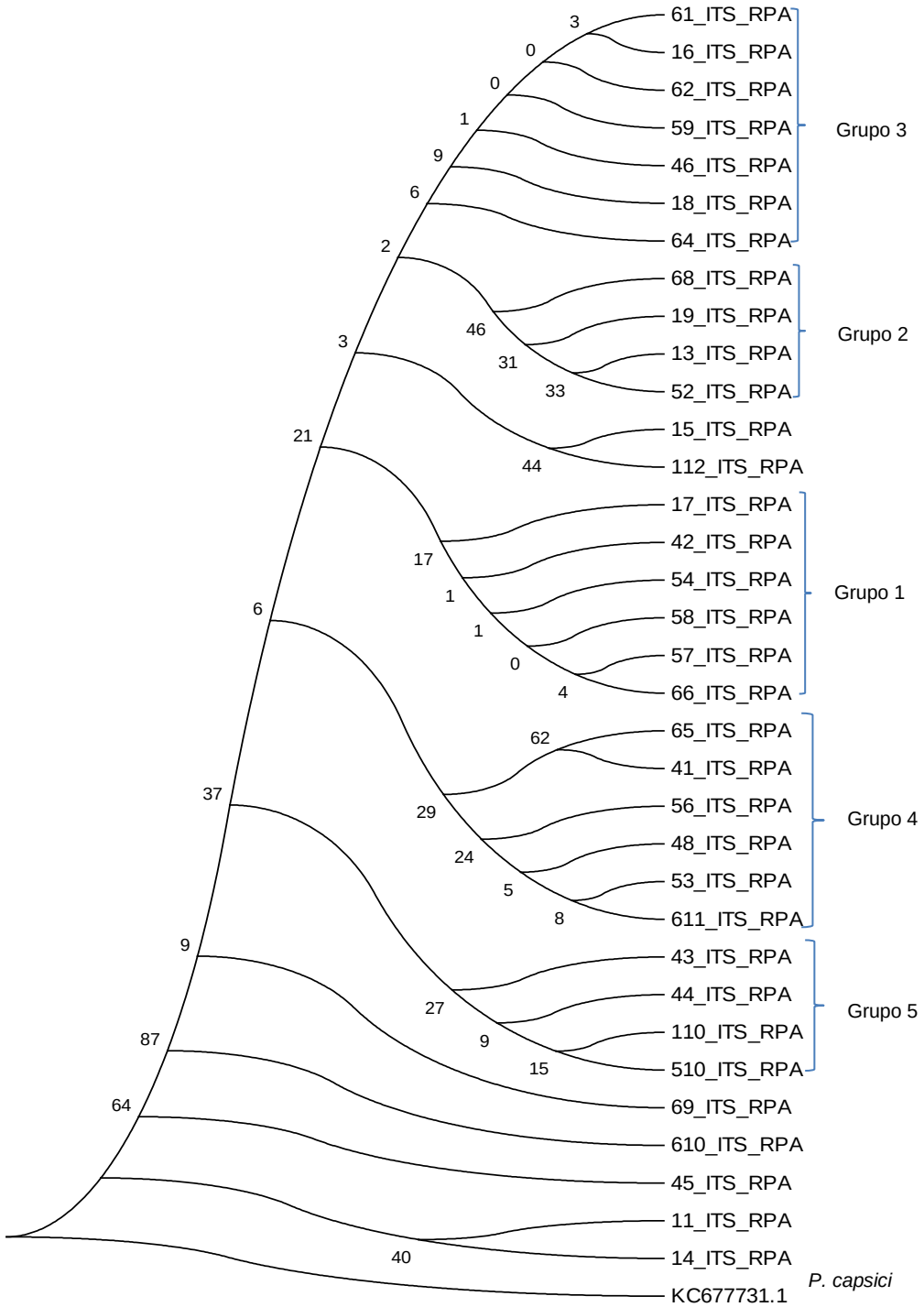

Figura 6. Dendograma construido utilizando el coeficiente de similitud de junta de vecinos y las secuencias RPA 190 de los genotipos identificados en Metepec, Méx.

3.4. DISCUSIÓN GENERAL

Se obtuvieron 35 aislamientos de las parcelas evaluadas en campos experimentales en Metepec, Estado de México. Del total de aislamientos las proporciones con base en su tipo de compatibilidad fueron: A1: 0.571, A2: 0.314 y A1/A2 (homotálicos): 0.114. Se obtuvieron dos aislamientos con niveles altos de resistencia a la dosis de 3600 $mg \cdot L^{-1}$ (dosis de campo), esto indica la necesidad de optar por otras medidas de manejo y hacer uso de los sistemas de rotación de fungicidas. La secuenciación de la región RPA 190, permitió identificar las diferencias en los genotipos de *Phytophthora infestans*, mientras que la región ITS, soló confirmó la relación del patógeno con aislamientos de *Phytophthora infestans* antes reportados.

Las secuencias obtenidas de los aislamientos de Metepec, Edo., México presentaron una homología del 99% con las especies de *P. infestans* reportadas en el GenBank por Nusbaum et al., (2010) y Chowdappa et al., (2013), asimismo con base a los resultados del análisis filogenético, se sustenta la teoría del origen de *P. infestans* propuesta por diferentes autores, los que designan a México como el centro de origen de dicho patógeno y en particular al Valle de Toluca, donde se presenta una gran diversidad genética y donde cada aislamiento es único o al menos uno de cada 10 presenta características partículares (Goodwin et al., 1992; Grünwald et al., 2001) lo que hace difícil integrar dichos aislamientos en un dendograma y poder explicar los factores que intervienen en la agrupación de los mismos.

Para investigaciones posteriores se recomienda secuenciar solo la región RPA 190, ya que con ella se puede hacer una clasificación dentro de aislamientos de la misma especie, así mismo amplificar algún otro gen de regiones mitocondriales, aportaría con mayor polimorfismo. Al hacer pruebas de resistencia a fungicidas, probar dosis que formen un crecimiento logarítmico, esto con la finalidad de hacer pruebas probit, sin complicación en la lectura de datos.

3.5. CONCLUSIONES

La caracterización de 35 aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de parcelas con aplicaciones de fungicidas en Metepec, Edo., México, comprueban la hipótesis de que estos ejercen una presión de selección que conduce a una mayor variabilidad y resistencia a fungicidas de las progenies de los Oomycetes sobrevivientes.

Se presentaron los dos tipos de apareamiento en los aislamientos evaluados, así como cuatro aislamientos homotálicos, rompiendo con la proporción de 1:1 de A1 y A2. Se encontraron dos aislamientos con resistencia a la dosis comercial de metalaxil, además de uno con resistencia intermedia a dicha dosis, los cuales tienen la característica de ser de tipo homotálicos.

La secuenciación de la región ITS nos confirmó la compatibilidad de *P. infestans* con los aislamientos obtenidos de campo, mientras que la secuenciación de la región RPA 190 permitió hacer una clasificación interna de los genotipos.

3.6. LITERATURA CITADA

Alarcón-Rodríguez N., Lozoya-Saldaña, H., Valadez-Moctezuma, E., García-Mateos, M., y Colinas-León, M. (2013). Diversidad genética de tizón tardío de la Papa (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) en Chapingo, México. *Revista Agrociencias*. 47(6):593-607. Retrived from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s1405-31952013000600006&script=sci_abstract_&Ing=en.

Belmar, D. C., y Lozoya, S. H. (2013). Incidence of Physiological race and genotypes of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Toluca Valley, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura,* XIX (2): 173-181. Doi: 10.5154/r.rchsh.2012.04.025.

Calderón, H. J., Castro, M., Gilchrist, E., Márquez, E., Jaramillo, S. (2002). Caracterización de las poblaciones de *Phytophthora infestans* presentes en los Departamentos de Boyacá y Cundinamarca. En: XXIII Congreso de la Asociación Colombiana de Fitopatología (ASCOLFI). Nuevas 138 Tendencias en

Fitopatología. Bogotá, Colombia, 46p. http://www.bdigital.unal.edu.co/24340/1/21489-73409-1-PB.pdf

Cartel, C. E. and Jinks, J. L. (1968). Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. *Cultural variation*. Can. J. Bot. 46: 329-348. https://doi.org/10.1139/b68-055.

Chowdappa, P., Kumar, N., Madhura, S., Kumar, M., Myers, K., Fry, W. E., Squires, J. N., y Cooke, L. D. (2013). Emergence of 13-A2 blue lineage of *Phytophthora infestans* was responsible for severe outbreaks of late blight on tomato in south-west India. *Journal of Phytopathology*. 161(1):49-58. Doi:10.1111/jph.12031.

Cooke, L., D., Drenth, A., Dunca, J. M., Wagels, G., y Bresler, C. M. (2000). A molceular Phylogeny of *Phytphpthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 30:17-32. Doi: 10.1006/fgbi.2000.1202.

Daayf, F., Platt, H., Mahuku, G., and Peters, R. (2001). Relationships Between Pathotypes and RAPDs, Gpi-Allozyme Patterns, Mating Types, and Resistence to Metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. *American Jourdan of Potato Research.* 78:129-139. https://doi.org/10.1007/BF02874768

Damicone, J. (2004). Fungicide resistance management. Coopeative Oklahoma Extensión Service EPP-7663. Stillwater. OK. Duncan, J. M. 1999. *Phytophthora* and bidigin threat to our crops. *Microbiol.* Today 26: 114-116. Retrived from http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Rendition-3508/F-7663web.pdf.

Deahl, K. L., Demuth, S. P., Sindel S. L., and Rivera, A. (1995b). Identification of mating types and matalaxyl resisstance in north america populations of *Phytophthora infestans. America Potato* J. 72: 35-49. https://doi.org/10.1007/BF02874378

Deahl, K. L., y Demuth, S. P. (1995). Genetic and phenotypic diversity in populations of *Phytophthora infestans* In: The united states of America. Dublin. Ireland. EAPR, Boole Press.

Fernández-Pavía, S. P., Rodríguez-Alvarado, G., Garay-Serrano, E., Belmar-Díaz, C.R., Styrbaum A.K., Flier W y Lozoya-Saldaña, H. (2005). Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary provenientes de Michoacán, México. *Revista Méxicana de Fitopatologia* 23:191-197. http://www.redalyc.org/pdf/612/61223213.pdf

Flier, W. G., And Turkensteen, L. J. (1999). Foliar aggressiveness of *Phytophthora infestans* in three potato growing regions in the Netherlands. *European Journal of Plant Pathology.* 105: 381-388.

Fry, W. E. (2008). Plant diseases that changed the world, *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathology.* 9: 385–402. Doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x

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., Spielmnan, L. J., Deahl, K. L., Inglis, D. A., and Sandlan, K. P. (1993). Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Diseases.* 77:653–661.

Gamez, R. C., y Ramírez, R. E. (2008). Determinación de la concentración letal media (CL50-48) del herbicida Roundup 747 sobre ecosistemas acuáticos mediante pruebas toxicológicas con *Daphnia magna*. Universidad de la Salle, facualtada de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Bogotá, Colombia. 103-110. Retrieved from http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/14062/T41.08%20G145d.pdf?sequence=1

Garay- Serrano, E. (2005). Variabilidad genetica de poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mon) de Bary en México. Tesis de Maestria. Instituto de Fitosanidad, C. P. Montecillos, Edo., de México. 79p.

García, G. H., Marín, M., Jaramillo, S., y Cortes, J, M. (2008). Sensibilidad de aislamientos colombianos de *Phytophthora infestans* a cuatro fungicidas. *Agronomía colombiana*. 26(1) 47-57. Retrived from http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/

Gavino, P. D., Smart, C. D., Sandrock, R. W., Miller, J. S., Ham, P. B., Lee, T. Y., Davis, R. M., and Fry, W. E. (2000). Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: Generation of and aggressive lineage. *Plant Disease.* 84: 731-735. Retrived from https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.7.731

Gissi, U and Cohen, Y. (2002). Resistence to phenylamide: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. Annu. *Revisit Phytopathol*ogy. 34: 549-572. DOI:10.1146/annurev.phyto.34.1.549

Gómez, A. L., Carbone I. and Ristaino J.B. (2007). An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proc.Nac. Acad. Sci.* 104:3306-3311. Doi: 10.1073/pnas.0611479104

Goodwin S.B. Spielmnan, L.J. Matuszak, J.M. Bergeron, S. N., and Fry W. E. (1992). Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* Population in Northem and Central Mexico*. Phytopathology* 82:955-961. Retrieved from http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n09_955.PDF

Goodwin S.B. Y Fry E.W. (1995). Recent migrations of *Phytophthora infestans*. In: Dowley LJ, Bannon E, Cooke RL, Keane T, Andosullivan E, Editores, *Phytophthora infestanas* 150. Dublin (Irlanda): Boole Press. 89-95.

Goodwin, S. B., Schneider, R. E., y Fry, W. E. (1995). Use of Cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans. Plant Disease*. 79:1181. http://aims.fao.org/serials/c_93962cb6

Groves C.T., and Ristaino J. B. (2000). Commercial fungicide formulation induces In: Vitro oospore formation and phenotypic change in mating in *Phytophthora infestans. Phytopathology.* 90:1201-1208. Doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.11.1201.

Grünwald, N. J., W. G. Flier, A. K. Sturbaum, S. E. Garay, T. B. M. Van Den Bosch, C. D. Smart, J. M. Matuszak, S. H. Lozoya, L. J. Turkensteen and W. E. Fry, (2001). Population Structure of *Phytophthora infestans* In: The Toluca Valley Region Of Central Mexico. *Phytopathology*. 91:882-890. Doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.9.882.

Henfling, J. W. 1987. Late Blight of Potato: *Phytophthora infestans*. Technical Information Bulletin 4. International Potato Center, Lima, Perú. (Second edition, revised). 25.

Jaimasit, P. and W. Prakob. (2010). Characterization of *Phytophthora infestans* population in potato crops from Chiang Mai and Tak Provinces. *Journal of Agricultural Technology* 1: 117-125. http://www.ijat-aatsea.com/pdf/April_v7_n2_11/21%20IJAT2010_101%20FJ.pdf

Jaramillo, V. S. 2003. Monografía Sobre *Phytophthora infestans* (Mont De Bary. Universidad Nacional De Colombia. 138.

Koh, Y. J., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Cohen, B. A., Ogoshi, A., Sato, N., Fry,W. E. (1994). Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries. *Phytopathology*. 84: 922–927. Doi: 10.1094/Phyto-84-922.

López, B. J., Márquez, M. E., Jaramillo, S., Zapata, L., Mazo, J. J., y Patiño, L. F. (1997). Determinación de razas fisiológicas y tipo de apareamiento en aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Revista Latino Americana de la Papa* 9/10: 156-170. https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5512011.pdf

Lozoya-Saldaña, H., Robledo-Esqueda, M., Rivas-Valencia, P., Sandoval-Islas, S., Colinas-León, T., Navas-Díaz, C. (2017). Sensitivy to fungicides of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary in Chapingo, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(3): 2-10. Doi:http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.004.

Matson, M., Small, I., Fry, W., and Judelson, H. (2015). Metalxyl Resistence *Phytophthora infestans:* Assesing Role of RPA 190 Gene and Diversity Within Clonal Lineages. *Plant Pathology and Microbiology*. 105, 12: 1594-1600. Doi: 10.1094/PHYTO-05-15-0129-R

Murray M. G. y W. F. Thompson. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8(19):4321-4326.

Niederhause, J.S. (1991). *Phytophthora infestans*: The Mexican Connection In: Lucas, J.A., R.C. Shattock, D.S., Shaw And L.R. Cooke. 1991 *Phytophthora infestans*. Cambridge University Press. New Your 447.

Nusbaum, C., Raffaele, S., Farrer, R. A., Cano, L, M., Studholme, D. J., MacLean, D., Thines, M., Jiang, R. H., Zody, M. C., Kunjeti, S. G., Donofrio, N. M., Meyers, B. C., y Kamun, S. (2010). Genome evolution followin host jumps in the Irsh potato famine pathogen linaje. *Plan science.*33D(6010):1540-1543, Doi: 10.1126/science,1193070.

Páez, O., Valverde, R., Gómez, L., y Brenes, A. (2001). Resistencia de aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxil en el cultivo de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense.* 25: 33-44. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43625103

Pérez, W. y Forbes, G. (2008). Manual Técnico El Tizón Tardío De La Papa. Centro Internacional de la papa. Perú. 18-30.

Randall, E., Young, V., Sierotzki, H., Scalliet, G., Birch, P., Cooke, D., Csukai, M, and Whisson, S. (2014). Sequence diversity in the large subunit of RNA polymerase I costribute to Mefenoxam insensitivity in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plan Pathology.* 15: 664-676. Doi: 10.1111/mpp.12124.

Rekanovi, E., Potoenik, I., Milijasevic, S., Stepanovic, M., Todorovic, B., and Mihajlovic, M. (2012). Toxicity of metalaxil, azoxistrobin, dimethomorph, cymixanil, zoxamide and mancozeb to Phytophthota infestans isolates from Serbia. *Jourdan of Environmental Sciencie* and Hearth, Part B: pesticedes, Food Contaminats, and Agricultural Waster, 47:5, 403-409. Doi: 10.1080/03601234.2012.657043.

Riveros, F., Sotomayor, R., Rivera, V., Secor, G., y Espinoza, B. (2003). Resitencia de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary a metalaxil en cultivo de papas en el norte de Chile. Agricultura técnica 63(2): 117-124. http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072003000200001

Runno, E., y Koppel, M., 2006. The question of metalaxil resitence on late blingt fungus in Estonia. *Agronomy Research* 4:341-344. Retrieved from http://agronomy.emu.ee/vol04Spec/p4S44.pdf

Shattock, R. C. (1988). Studies on the inheritance of resistence to metalaxil in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*. 37: 4-11. Doi: 10.1111/j.1365-3059.1988.tb02188.x

Silva, B., S. Jaramillo, M. Marin. (2009). Caracterización genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en las zonas productoras de papa de los departamentos de Antioquía, Boyacá, Cundinamarca y Norte de Santander (Colombia). Actual Biol 31: 5-20. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0304-35842009000100001&lng=es&nrm=is

Spielmnan L. J., Drenth, A., Davidse, L.C., Sujkowski, L. J., Gu, W., Tooley P.W. And Fry W.E. (1991). A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans. Plant Pathology* 40:422-430. **Doi:** 10.1111/j.1365-3059.1991.tb02400.x

Tooley, P. W., B. A. Bunyard, M. M. Carras, and E. Hatziloukas. (1997). Development of PCR Primers from Internal Transcribed Spacer Region 2 for Detection of *Phytophthora* Species Infecting Potatoes. *Appl. Environ. Microbiology* 63: 1467-1475. Retrieved from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9097445