



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE
Phytophthora infestans (Mont.) de Bary EN CHAPINGO,
MÉXICO**

T E S I S

QUE PRESENTA:

NORMA MARINA ALARCÓN RODRÍGUEZ



**DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
ORICINA DE EXAMENES PROFESIONALES**

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

JUNIO DE 2011

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO



CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary EN CHAPINGO MEXICO

Tesis realizada por **Norma Marina Alarcón Rodríguez** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESIDENTE:



DR. HECTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR:



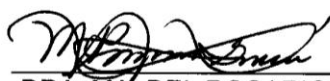
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



DRA. MARIA TERESA B. COLINAS LEÓN

ASESOR:



DRA. MA. DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

LECTOR EXTERNO:



DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a los contribuyentes de México quienes por conducto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) financiaron esta etapa de mi formación profesional.

A la Universidad Autónoma Chapingo, en especial al Instituto de Horticultura y a cada uno de los Doctores que lo conforman, por todas las enseñanzas y experiencias recibidas que contribuyeron a una formación académica y profesional de excelencia.

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

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por el apoyo invaluable, por la siempre amable disposición para asesorarme en la realización de esta investigación y la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Biología Molecular.

A la Dra. María Teresa Colinas León y a la Dra. Ma. del Rosario García Mateos por su apoyo, asesoría y disposición brindada en todo momento durante la realización de este trabajo.

A mi familia por su apoyo, amor, comprensión y la fortaleza para sobrellevar la lejanía durante este tiempo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular quienes siempre fueron comprensivos, amables, dispuestos a apoyarme en cualquier momento, especialmente a María del Carmen Juárez Vázquez.

DEDICATORIA

*A Jehová Dios por permitirme el amor,
serenidad y discernimiento necesarios para
conducirme en la vida que me ha concedido
hasta el momento.*

*A mi madre, la persona más valiosa en mi
vida, por ser el mejor ejemplo de amor,
superación y fortaleza. Por su apoyo
incondicional y todo lo que ha hecho para
formar una hermosa familia. Te amo Mami.*

*A mis hermanos Félix y Mary junto con su
bollito por el gran amor que nos tenemos,
que a pesar de todo siempre estaremos
unidos por todos los valores inculcados y el
amor impregnado en nosotros gracias a
nuestros padres.*

*A la memoria de mi padre, Sr. José Félix
Alarcón el ser más maravilloso que la vida
me ha dado a conocer. Mostrándome guía,
ejemplo, valor, rectitud y sobre todo amor en
todo momento.*

*A la memoria de mi hermano Manuel por
todo su amor, y por el apoyo recibido para
poder iniciar mis estudios profesionales.*

*A ti Efrén, gracias por coincidir conmigo y
compartir la vida, el regalo más bello es ser
amada y respetada por un gran hombre como
lo eres tú.*

DATOS BIOGRÁFICOS

NORMA MARINA ALARCÓN RODRÍGUEZ NACIÓ EN LA CIUDAD DE XALAPA, VERACRUZ, DONDE CURSÓ SUS ESTUDIOS DE EDUCACIÓN BÁSICA. EN EL AÑO 1993 INGRESÓ A LA FACULTAD DE BIOLOGÍA EN LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA ZONA XALAPA, DONDE OBTUVO EL GRADO DE LICENCIATURA, ADEMÁS DEL PRIMER LUGAR EN LA OLIMPIADA NACIONAL DE BIOLOGÍA EN EL MISMO AÑO. EN 1999 SE INTEGRÓ AL LABORATORIO DE ALTA TECNOLOGÍA DE XALAPA DEDICÁNDOSE A EL DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO EN DIVERSAS ÁREAS OBTENIENDO LAS APROBACIONES COMO SIGNATARIO EN EL ÁREA DE MALEZAS Y ENTOMOLOGÍA POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL. HA PARTICIPADO EN DIFERENTES EVENTOS CIENTÍFICOS.

EN EL AÑO 2004 INGRESÓ A LA MAESTRIA EN PROTECCIÓN VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO, DONDE FUE CONSIDERADA DOS VECES PARTE DEL CUADRO DE HONOR DE DICHO DEPARTAMENTO, EGRESÓ EN EL 2006 Y POSTERIORMENTE APROBÓ SU EXAMEN DE GRADO CON MENCIÓN HONORÍFICA.

A PARTIR DEL 2007 INGRESÓ A LABORAR EN EL GRUPO INTEGRAL DE SERVICIOS FITOSANITARIOS ENA (GISENA) DESEMPEÑÁNDOSE COMO SIGNATARIO DE TIEMPO PARCIAL EN ENTOMOLOGÍA.

EN EL 2010 INGRESÓ COMO PROFESOR INVESTIGADOR DE TIEMPO COMPLETO EN EL ÁREA DE BIOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE PREPARATORIA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO.

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary EN CHAPINGO, MEXICO.

Norma Marina Alarcón Rodríguez, Doctora en Ciencias en Horticultura, Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Bajo la Dirección Dr. Héctor Lozoya Saldaña

El tizón tardío causado por el Oomyceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más devastadoras de las solanáceas a nivel mundial. En 1845 causó en Irlanda la destrucción total de los campos de papa, ocasionando hambruna y muerte a miles de personas y la migración de sobrevivientes a otros lugares de Europa y Norte América. *P. infestans* presenta una alta incidencia, severidad y diversidad genotípica, gracias en parte a sus progenies derivadas sexualmente. Por ello es importante caracterizar las poblaciones de las regiones donde se presenten los grupos de compatibilidad, como es el caso de Chapingo, México. En el presente estudio se trabajaron 88 aislamientos de *P. infestans* obtenidos del campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, durante los años 2008, 2009 y 2010, mediante perfiles isoenzimáticos multiloci, haplotipos mitocondriales, análisis de las divergencias de secuencias de genes nucleares como β -tubulina, intron Ras y Ras así como regiones ITS de ADN ribosomal.

Predominó la población homotética (A1A2) con una frecuencia de 0.761. Se identificaron 25 genotipos mediante perfiles isoenzimáticos, siendo el más frecuente el A1A2; 100/100; 86/100 (grupo de compatibilidad; *Pep*; *GPI*). El índice de diversidad genotípica fue de 1.8 (Shannon), y solo se detectó al haplotipo mitocondrial Ia. Las

secuencias de los genes nucleares de los aislamientos de Chapingo fueron similares a las de los aislamientos andinos.

Palabras clave adicionales: Tizón tardío, isoenzimas, haplotipos mitocondriales, secuencia de genes nucleares.

CHARACTERIZATION OF GENETIC DIVERSITY OF *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary IN CHAPINGO, MEXICO.

ABSTRACT

Late blight, caused by the Oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, is one of the most devastating solanaceous diseases worldwide. In 1845 it was responsible for the total destruction of the potato fields in Ireland, causing famine and death to thousands and the migration of survivors to other places in Europe and North America. *P. infestans* shows a high incidence, severity and genotypic diversity mainly due to its sexually derived progenies. Because of that, it is important to characterize its populations from the areas where the mating types are present, such as in Chapingo, Mexico. This study analyzed 88 *P. infestans* isolates from the Autonomous University of Chapingo experimental station collected in 2008, 2009, and 2010, through multiloci isozyme profiling, mitochondrial haplotypes, and sequence divergence analysis of nuclear genes like β -tubulin, Ras and Ras intron, as well as ITS regions of ribosomal DNA.

The homothallic population was predominant (A1A2), with a frequency of 0.761. Twenty five genotypes were identified based on isozyme profiles. The most frequent was A1A2; 100/100; 86/100 (mating type; *Pep*; *GPI*). The genotypic diversity index was 1.8 (Shannon), and only the mitochondrial haplotype Ia was detected. The nuclear genes sequences of the isolates from Chapingo were similar to those from the Andes.

Additional key words: Late blight, isozymes, mitochondrial haplotypes, nuclear genes sequence.

INDICE GENERAL

SECCION	CONTENIDO	PAGINA
	INDICE GENERAL	i
	INDICE DE FIGURAS	iii
	INDICE DE CUADROS	v
	RESUMEN	vi
	ABSTRACT	vii
	CAPITULO 1	1
I	INTRODUCCION GENERAL	
	OBJETIVO GENERAL	4
	OBJETIVOS ESPECIFICOS	4
	HIPOTESIS	4
	CAPITULO 2	7
II	REVISION DE LITERATURA	7
	CAPITULO 3	
III	DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>Phytophthora infestans</i> (de BARY) EN CHAPINGO, MÉXICO	28
	RESUMEN	28
	ABSTRACT	29
3.1	INTRODUCCION	30
3.2	MATERIALES Y METODOS	32
3.3	RESULTADOS Y DISCUSION	36
3.4	CONCLUSIONES	46
3.5	LITERAURA CITADA	46

	CAPITULO 4	51
IV	ANALISIS DE LA DIVERGENCIA DE LAS SECUENCIAS DE LAS REGIONES DE LOS GENES NUCLEARES β - <i>TUBULINA</i> , <i>RAS</i> , <i>INTRON RAS</i> E <i>ITS</i> DEL DNA RIBOSOMAL Y EN AISLAMIENTOS DE <i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> EN CHAPINGO, MÉXICO.	51
	RESUMEN	51
	ABSTRACT	52
4.1	INTRODUCCION	53
4.2	MATERIALES Y METODOS	56
4.3	RESULTADOS Y DISCUSION	60
4.4	CONCLUSIONES	68
4.5	RECOMENDACIONES	68
4.6	LITERATURA CITADA	69
	CAPITULO 5	
V	DISCUSION GENERAL	73
5.1	LITERATURA CITADA	75

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	CONTENIDO	PAGINA
Capítulo 1		
1	Ciclo de vida de <i>Phytophthora infestans</i>	9
2	Síntomas del tizón tardío en follaje y cultivo de papa	14
Capítulo 3		
1	Extracción de DNA Método de Goodwin <i>et al.</i> , y Método de Griffith y Shaw (1998).	42
2	Amplificación y digestión del fragmento P1 (23737-24854 genoma mitocondrial)	42
3	Amplificación y digestión del fragmento P2 (13619-14688 genoma mitocondrial)	43
4	Amplificación y digestión del fragmento P3 (gen <i>rpl14</i> , <i>rpl15</i> 2892-4199 genoma mitocondrial)	44
5	Amplificación del fragmento P4 (gen <i>cox1</i> 9329-19292 genoma mitocondrial).	44
6	Digestión del fragmento P4 (gen <i>cox1</i> 9329-10292 genoma mitocondrial)	45
Capítulo 4		
1	Gen Ras. Fragmento amplificado de 600 pb. Carriles 1 a 24 muestras, M. Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).	61
2	Gen <i>Intron Ras</i> (IRF). Fragmento amplificado de 223 pb y fragmento de 600 pb. Carriles 1 a 24 muestras, M. Marcador	62

de peso molecular de 1 kb (Promega).

3	Gen <i>β-tubulina</i> . Fragmento amplificado de 542 pb. Carriles 1 a 24 muestras, M. Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).	62
4	Región ITS. Fragmento amplificado de 950 pb. Carriles 1 a 24 muestras, M. Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).	63
5	Dendrograma construido con el coeficiente de similitud Neibor Joining, utilizando las secuencias del gen <i>Ras</i> de los genotipos de <i>P. infestans</i> de Chapingo, México.	64
6	Dendrograma construido con el coeficiente de similitud Neibor Joining, utilizando las secuencias del <i>intron Ras</i> de los genotipos de <i>P. infestans</i> de Chapingo, México.	65
7	Dendrograma construido con el coeficiente de similitud Neibor Joining, utilizando las secuencias del gen B- tubulina de los genotipos de <i>P. infestans</i> de Chapingo, México.	66
8	Dendrograma construido con el coeficiente de similitud Neibor Joining, utilizando las secuencias de ITS1 e ITS2 de los genotipos de <i>P. infestans</i> de Chapingo, México.	67

INDICE DE CUADROS

No.	CONTENIDO	PAGINA
Capítulo 3		
1	Aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> obtenidos de papa del campo experimental Chapingo, México.	36
2.	Genotipos multilocus de <i>P. infestans</i> de acuerdo a tipo de compatibilidad y perfil aloenzimático <i>Pep</i> y <i>Gpi</i>	38
3	Frecuencia de los genotipos de <i>Phytophthora infestans</i> identificados de acuerdo con el tipo de compatibilidad y aloenzimas <i>Pep</i> y <i>Gpi</i> .	41
Capítulo 4		
1	Frecuencia de los genotipos de <i>Phytophthora infestans</i> identificados de acuerdo con el tipo de compatibilidad y aloenzimas <i>Pep</i> y <i>Gpi</i> .	60

CAPITULO 1

I. INTRODUCCION GENERAL

La papa se ha constituido en una de las principales fuentes de alimento para el hombre, sin embargo la producción es afectada por diversas enfermedades, Hooker (1980) menciona entre los factores bióticos a 25 virus, 38 hongos, 6 bacterias, 2 micoplasmas y un viroide; además de 68 especies de nematodos y 128 insectos plaga, totalizando 266 patógenos y plagas; también los factores abióticos como heladas y sequía disminuyen la producción. Sin embargo el problema más limitante del cultivo de la papa en muchas regiones del mundo, y que se encuentra ampliamente distribuido en las zonas productoras, y puede llegar a ocasionar perdidas hasta del 100 %, lo constituye la gota o tizón tardío ocasionado por el oomyceto *Phytophthora infestans*, ya que puede devastar en corto tiempo los campos cultivados, llegando incluso a provocar grandes catástrofes de carácter socioeconómico.

El tizón tardío causado por el Oomyceto *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más devastadoras de las solanáceas a nivel mundial. En 1845 causó en Irlanda la destrucción total de los campos de papa, ocasionando hambruna y muerte a miles de personas y la migración de sobrevivientes a otros lugares de Europa y Norte América; esto fue solo con la primera migración del tipo de apareamiento A1 de *Phytophthora infestans*. Posteriormente el patógeno se diseminó por todas las regiones donde se ha cultivado la papa trayendo como consecuencia una nueva migración, pero esta vez de patotipos más agresivos (Arneson, 1998). En 1984 se reportó el tipo de apareamiento A2 en el oeste de Europa, dicho aislamiento se consideraba inexistente fuera de México. Debido a estos antecedentes se han realizado numerosos estudios sobre la etiología, epidemiología y control de la

enfermedad, ya que se han desarrollado nuevas poblaciones del patógeno en todo el mundo. Esta enfermedad se presenta en áreas donde las condiciones del ambiente son continuamente favorables (temperatura promedio de 20 °C y agua por lluvia o zona húmedas donde se da la condensación por el punto de rocío), las predicciones hechas en la dinámica de dispersión del patógeno son de poco valor (Erwin y Ribeiro, 1996), aunque generalmente se controla con fungicidas, éstos inciden significativamente en los costos de producción, afectan al medio ambiente y a la salud humana e inducen a la aparición de nuevas razas del patógeno resistentes a fungicidas. La resistencia que viene presentando el fitopatógeno a los fungicidas, la gran carga de residuos químicos que son depositados en suelos, aguas y plantas, ocasionando daños al medio ambiente y al ser humano, han llevado al desarrollo de nuevas variedades de tomate y papa que sean más resistentes a la gota (tizón tardío) y necesiten de menores concentraciones de agroquímicos (Álvarez, 1996).

Por ello se requiere un estudio detallado de las poblaciones genéticas del patógeno y la implementación de técnicas bioquímicas y moleculares han permitido realizar análisis de la genética de poblaciones del patógeno. Estos análisis dieron a conocer los peligros para la producción de papa que ocurrían después de los procesos de variación genética del patógeno, principalmente debido a la aparición de variantes con mayor resistencia a los fungicidas sistémicos, mayor virulencia y mayor aptitud parasítica, así como a la presencia de oosporas como fruto de la reproducción sexual del patógeno en nuevas zonas agrícolas.

A partir 1956, se estableció el Valle de Toluca (México) como centro de origen del patosistema *Phytophthora infestans* - *Solanum tuberosum*, dado que allí se reportó inicialmente la presencia de los dos tipos de apareamiento A1 y A2 (Galindo y

Gallergly, 1960; Tooley *et al.*, 1989; Fry *et al.*, 1993; Fry y Goodwin, 1997), lo cual permite la propagación sexual y conduce a una mayor diversidad genética del patógeno.

La forma más adecuada para enfrentar el tizón tardío es mediante el estudio y la caracterización de las poblaciones locales para conocer su tipo de compatibilidad, perfil aloenzimático (Spielman, 1991; Erwin y Ribeiro 1996), haplotipo mitocondrial (Griffith y Shaw, 1998), la secuencia de su información genética en genes nucleares y mitocondriales (Gómez-Alpizar *et al.*, 2007; Cárdenas *et al.*, 2011) y las regiones espaciadoras transcritas (ITS) (Tooley *et al.*, 1997) de tal manera que provean la información suficiente para diseñar el manejo contra el aislamiento específico de *P. infestans* que está ocasionando la enfermedad utilizando todas las técnicas que conlleven al manejo integrado de la enfermedad, como son las medidas de prevención, el cumplimiento de las normas sanitarias para el transporte de material vegetal, las cuarentenas, el uso de variedades resistentes, semillas sanas y certificadas, así como el control químico adecuado. Debido a la relevancia del patógeno y a la necesidad de relacionar criterios de clasificación, el objetivo de esta investigación fue caracterizar la variabilidad genética de *Phytophthora infestans* en poblaciones aisladas de clones de papa en Chapingo, México, así como, establecer la relación existente con otras clasificaciones realizadas del patógeno, mediante el empleo de marcadores bioquímicos (aloenzimas y tipo de compatibilidad) y marcadores moleculares como determinación haplotipos mitocondriales, regiones ITS y genes nucleares.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar la diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de Chapingo, Edo de México mediante el empleo de marcadores bioquímicos y moleculares.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.3.1 Identificar a que haplotipos mitocondriales pertenecen los aislamientos obtenidos durante los ciclos 2008, 2009 y 2010 en la zona de estudio, mediante técnicas moleculares.

1.3.2 Establecer las relaciones filogenéticas de los aislamientos encontrados en Chapingo en relación con los reportados para México y otras partes del mundo, mediante la comparación de secuencias (GenBank).

1.3.3 Determinar si existe una relación entre las distintas clasificaciones del patógeno.

1.3 HIPOTESIS

Ho: El análisis molecular, mediante isoenzimas, haplotipos mitocondriales y secuenciación de genes nucleares, permitirá caracterizar la diversidad genética de *Phytophthora infestans* en aislamientos de Chapingo, México.

Ha: El análisis molecular, mediante isoenzimas, haplotipos mitocondriales y secuenciación de genes nucleares, no permitirá caracterizar la diversidad genética de *Phytophthora infestans* en aislamientos de Chapingo, México.

1.4 LITERATURA CITADA

- Alarcón, J., Galindo, J. 2001. Plagas y Enfermedades de la Papa. ICA, Boletín de Sanidad. pp 66-74.
- Álvarez, M. 1996. Variedad de tomate INCA-17. *Cultivos Tropicales*. 17:81-82.
- Arneson, P.A. 1998. Tizón En: Biological control. Universidad de Cornell. 37 p
- Cárdenas, M., Grajales. A., Sierra, R., Rojas, A., González, A. A., Vargas, A., Marín, M., Fermín, G., Lagos, L. E., Grünwald, N. J., Bernal, A., Salazar, C. and Restrepo, S. 2011. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean región. *BMC Genetics* 12:23 www.biomedcentral.com/1471-2156/12/23. 26052011.
- Erwin, D.C. and Ribeiro. O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota. The American Phytopathology Society. 562. p
- Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T, Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujkowski, L. S., Koh, Y. J., Cohen, B. A., Spielman, L. J., Deahl, K. L., Inglis, D. A., and Sandlan, K. P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. *Plant Dis.* 77:653–661.
- Fry, W.E; Goodwin, S.B. 1997. Resurgence of the Irish Potato Famine Fungus. *Bioscience* 47:363-371.
- Galindo, J. and Gallegly, M. E. 1960. The Nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 50: 123-128.
- Gómez-Alpizar, 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.

Griffith G. W. and Shaw D.S. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4007-4014.

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

Spielman 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.

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.

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.

CAPITULO 2

II. REVISION DE LITERATURA

Phytophthora infestans es el agente que causa la gota tizón tardío de la papa. Matius de Prusia en 1842, lo llamo *Gangraena tuberum solani*, cuando describió por primera vez al hongo que causó la enfermedad que devastó el follaje y los tubérculos de papa en casi toda Europa, hubo muchas teorías para explicar la nueva enfermedad que apareció en la papa en Europa, pero la mayoría de los comentarios se basaban en el clima lluvioso y la polución industrial. Hacia 1845, Morren de Bélgica escribió varias cartas en las que sostenía que un hongo era la causa del tizón en la papa. Después de algunas dudas Montagne aceptó la teoría de Morren y con la información que tenía describió el género *Botrytis infestans*, el cual conocemos hoy como *Phytophthora infestans*, que fue confirmada posteriormente por Anthony de Bary (Erwin y Ribeiro, 1996).

2.1 Taxonomía y Clasificación

Phytophthora infestans es un organismo perteneciente al Filo Oomycota, al Reino Protista (Cromista), agrupa a más de 700 especies, las cuales se caracterizan por poseer dos flagelos en las zoosporas, no contienen pigmentos fotosintéticos, presentan paredes formadas por celulosa o polímeros similares a la celulosa, hábitos acuáticos y terrestres, aunque siempre necesitan la presencia del agua (Erwin y Ribeiro, 1996; Jaramillo, 2003).

Por sus formas filamentosas parecidas a hifas, este organismo se agrupó originalmente con el grupo de los hongos dentro del Reino Fungi, (Lucas *et al.*, 1991), pero luego se confirmó mediante las filogenias moleculares de las secuencias de RNA ribosomal, datos de los aminoácidos compilados para las proteínas de la mitocondria y

cuatro proteínas que codifican para los genes cromosómicos, que los Oomicetes adquirieron la habilidad de infectar las plantas de manera independiente de los hongos verdaderos (Kamoun, 1999).

Estas investigaciones demostraron que los oomycetos están más relacionados con las algas, ya que presentan una alta homogeneidad en las secuencias moleculares de la subunidad 18S y 28S del rDNA, realizan meiosis en los gametangios y poseen núcleos vegetativos diploides (Lucas *et al.*, 1991). Otros estudios realizados a proteínas de genes cromosómicos evidenciaron que tenían un mecanismo de infección a las plantas muy diferente e independiente de los hongos verdaderos (Kamoun, 1999)

Las características que diferencian el género *Phytophthora* de los hongos se basan en la morfología de las crestas mitocondriales (tubulares) y la bioquímica de las paredes celulares, las cuales en vez de quitina contienen β -1,3-glucano junto con microfibrillas de celulosa (Erwin y Ribeiro, 1996).

Phytophthora infestans presenta la siguiente clasificación taxonómica (Jaramillo, 2003).

REINO: Cromista (grupo Stramenophyle)

PHYLUM: Oomycota

CLASE: Oomycete

SUBCLASE: Peronosporomycetidae

ORDEN: Pythiales

FAMILIA: Pythiaceae

GENERO: *Phytophthora*

ESPECIE: *infestans*

2.2 Ciclo de vida

Phytophthora infestans es un organismo heterotálico con dos tipos de apareamiento, A1 y A2, que se cree proceden de Toluca, México. Hasta 1980, el tipo de apareamiento A2 estaba confinado a México, y se consideraba que solo el tipo A1, era el causante del tizón tardío en las demás regiones del mundo (Goodwin *et al.* 1994). Sin embargo, a partir de 1981 se presentaron reportes de la distribución del tipo de apareamiento A2 en varios países de Europa, Oriente medio, Asia y Sur América (Fry y Goodwin 1995); lo que ha conducido que la población A1 haya sido desplazada por una nueva variante A1/A2. Dicha población ha resultado de la reproducción sexual de ambos tipos y se caracteriza por ser altamente virulenta y variable, estas condiciones le ha permitido adaptarse a nuevos hospedantes y a diferentes condiciones medioambientales (Fry *et al.* 1993, Fry y Goodwin 1995).

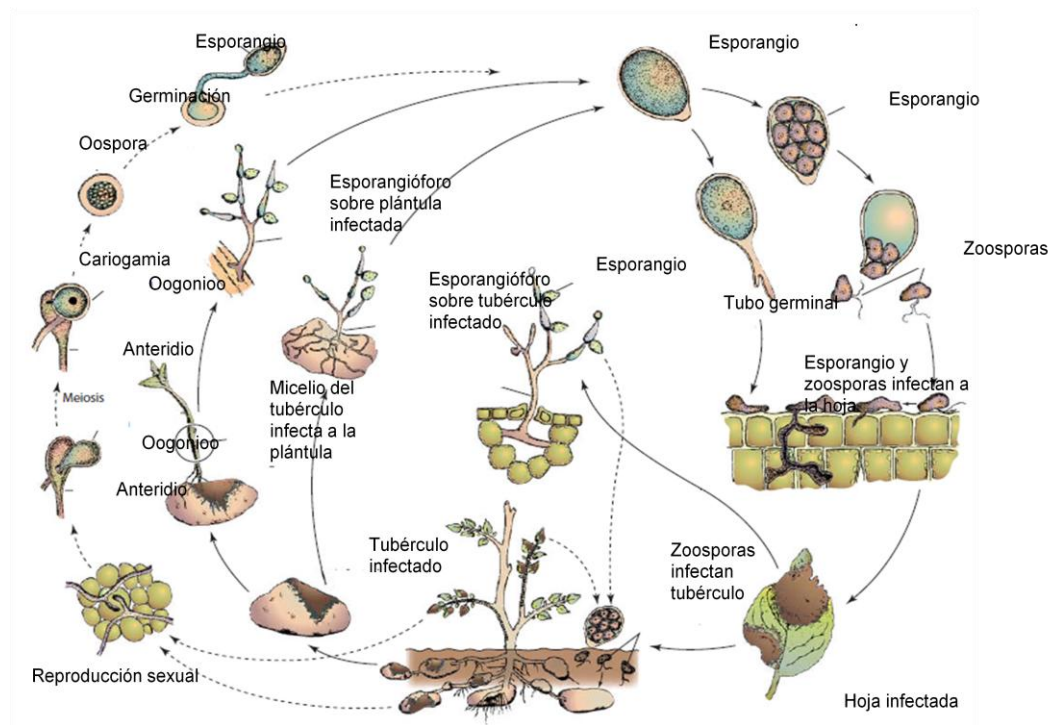


Figura 1. Ciclo de vida de *Phytophthora infestans* (Agrios, 2005).

2.3. Reproducción Asexual y Sexual

Phytophthora infestans presenta dos tipos de reproducción, el esporangio (zoosporangio) es la unidad de reproducción asexual, el cual puede ser producido en abundancia en muchas especies de huéspedes. Una sola lesión puede producir hasta 300.000 esporangios en una noche (Smart *et al*, 2000). El micelio de este oomicete produce esporangióforos ramificados de crecimiento indeterminado, en las puntas se forman esporangios papilados de forma alimonada, los cuales realizan la producción de zoosporas, pero conforme prosigue el crecimiento de las puntas de las ramas, los esporangios son desplazados hacia los lados y más tarde se desprenden. En los sitios donde se forman los esporangios, los esporangióforos forman hinchamientos que son una característica particular del oomicete (Agrios, 1999).

Los esporangios son estructuras hialinas con un tamaño que oscila entre 18-24 nm por 25-35 nm, separados del micelio por una septa. Cada esporangio tiene de seis a diez núcleos, que se desprenden fácilmente de los esporangióforos cuando maduran y son arrastrados por el viento que los dispersa y los cambios de humedad relativa que los ayudan a germinar en los tejidos de las plantas huéspedes, mediante la germinación directa a través de un tubo germinativo o indirectamente al producir zoosporas (Smart *et al*, 2000).

En condiciones húmedas los esporangios germinan a temperaturas altas; entre 18-24 °C se produce un tubo germinativo que penetra directamente la cutícula de la hoja y a temperaturas bajas se lleva a cabo la liberación de 3 a 8 zoosporas biflageladas dentro del esporangio, luego que se rompe la pared de este, las zoosporas se enquistan y penetran la hoja del hospedero.

Según Turkesteen (2000) hay dos tipos de esporas, las más frecuentes son las zoosporas, que son hialinas y de pared delgada y tiene forma de limón, con un tamaño de 21-38 nm X 12-23 nm ubicadas en las puntas de las ramificaciones del micelio, otro tipo son las oosporas, cuerpos redondos de 24-26 nm, con paredes gruesas. Bajo condiciones secas, los esporangióforos empiezan a retorcerse y el esporangio se desprende, bajo estas condiciones los zoosporangios son de vida corta, al igual que si no encuentran el tejido huésped apropiado. La germinación se da en agua libre, de manera directa por la emisión de un tubo germinativo, pero comúnmente se liberan ocho o más zoosporas, las cuales nadan con la ayuda de los dos flagelos, luego estas se enquistan y forman el tubo germinativo para infectar.

En la reproducción sexual de *P. infestans* participan anteridios anfígenos y oogonios, estructuras que deben corresponder a tipos de apareamiento diferentes, debido a la condición heterotálica del patógeno (Erwin y Ribeiro 1996). La producción de oosporas es estimulada por la presencia de sustancias hormonales tipo esterol. Estas esporas son típicamente estructuras de resistencia gracias a su fuerte pared y germinan por medio de un tubo a partir del cual se producen esporangios o directamente micelio (Wen-Hsiung 1998; Agrios 1999).

El tipo de apareamiento es un factor importante tanto en las variaciones de las poblaciones y el tipo de reproducción del oomicete, es así como el tipo de apareamiento A2 tiene gran tendencia a la autofertilización (96 %, n=47), mientras que en el A1 es escasa (6 %, n=69) (Jaramillo, 2003). La reproducción sexual sirve para proporcionar un estado de supervivencia de las esporas (oosporas) y generar nuevas combinaciones de genes.

Estudios de sobrevivencia a largo plazo, de las oosporas (sexual) y esporangios y micelio (asexual), realizados sobre hojas quemadas por la gota en el campo, permitieron detectar el inóculo de tipo sexual y asexual hasta por 12 y 21 meses después de la quemazón de las hojas (López *et al.*, 1997).

2.4 Biología de *Phytophthora infestans*

Dada la habilidad de *P. infestans* para la manipulación bioquímica, fisiológica y morfológica en su hospedante a través de la formación de diversas moléculas de virulencia definidas como “efectoras o elicitores”, es necesario realizar estudios de genómica estructural, con el fin de entender las bases moleculares de la patogenicidad de *P. infestans*, conocer la diversidad genética de las poblaciones existentes en las regiones infectadas, ya que está relacionada con la eficacia y la eficiencia de los métodos de combate. Entre los métodos para caracterizar su diversidad se encuentran los marcadores fenotípicos y genotípicos (Spielman *et al.*, 1991; Goodwin *et al.*, 1992; Goodwin *et al.*, 1995; Griffith y Shaw, 1998; Gómez -Alpizar *et al.*, 2007; Jaimasit y Prakob, 2010).

2.5 Sintomatología del Tizón Tardío

Phytophthora infestans se disemina por 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 la zona de penetración en la planta. El periodo máximo de movilidad oscila entre 20 y 30 h que le permite desplazarse varios centímetros de distancia (Lucas *et al.*, 1991).

Las zoosporas se mueven sobre la superficie vegetal en gotas de agua hacia los estomas de la planta hospedante, mediante el fenómeno denominado quimiotaxis se activan señales por quimiorreceptores que ocasionan su germinación de forma indirecta (Lucas *et al.*, 1991), se lleva a cabo la formación del tubo germinativo que se adhiere a la superficie vegetal mediante la producción de una matriz extracelular que se compone generalmente de polisacáridos o glicoproteínas, penetrando la cutícula o aprovechando las aberturas naturales, para este proceso se necesitan periodos de alta humedad, una vez dentro se establece una relación trófica que le permite obtener sus nutrientes, el micelio crece dentro de los tejidos y eventualmente vuelve a producir estructuras reproductivas (Hold, 1991; Niederhauser, 1991; Agrios, 2005).

El tipo de lesión varía con la temperatura, humedad, intensidad lumínica y variedad del hospedante. Los síntomas iniciales se presentan como manchas pequeñas de color verde claro a verde oscuro, de forma irregular. Bajo condiciones favorables, las lesiones se convierten en áreas necróticas grandes de color castaño a negro purpúreo, que pueden ocasionar la muerte de los folíolos y avanzar por los pecíolos hasta el tallo, finalmente puede matar la planta afectada (Alarcón, 2001). Generalmente se observa un halo de color verde claro amarillento en la parte externa de la zona necrótica de la hoja, sin embargo bajo condiciones favorables de humedad en el ambiente, aparece sobre ella un crecimiento blanquecino constituido por esporangios y esporangióforos en el borde de las lesiones, principalmente en el borde inferior de la hoja (Keen, 2000; Pérez y Forbes, 2008).

En las hojas produce manchas castañas a negras, sin embargo cuando las condiciones ambientales son muy favorables al parásito, aparecen las fructificaciones blancas del oomicete especialmente en la cara inferior, en el tallo se forman manchas

como si hubiese sido quemado por efectos de las heladas, en el fruto hay una decoloración castaña oscura con bordes definidos, frecuentemente cubierta por la fructificación del parásito, estos síntomas y signos aparecen en cualquier etapa del desarrollo, luego se manifiesta una pudrición de aspecto acuoso en la parte externa del fruto, la cual aumenta progresivamente (Carrasco *et al.*, 1997, Pérez y Forbes, 2008).

Las lesiones se expanden rápidamente, se tornan marrón oscuro, se necrosan y causan la muerte del tejido, las plantas severamente afectadas emiten un olor característico, debido a la rápida descomposición del tejido foliar.



Figura 2. Síntomas del tizón tardío en follaje y cultivo de papa en Chapingo, México.

2.6 Origen y distribución de *Phytophthora infestans* Mont de Bary

El agente causal de “tizón tardío”, *Phytophthora infestans*, es el resultado de una serie de pasajes de razas que afectan a *S. tuberosum*, a través de los tejidos foliares. El determinar el centro de origen donde ha ocurrido esta coevolución ha dado origen a profundas conjeturas científicas, desde 1950 algunos autores señalan el centro de México (Valle de Toluca) como el sitio de origen, esta opinión es respaldada por el hecho de haberse encontrado los grupos de compatibilidad sexual A1 y A2, y por la alta complejidad genética y diversidad de razas fisiológicas (Goodwin *et al*, 1992). Eventualmente, el patógeno evolucionó en especies silvestres de *Solanum* en la parte central de México y muy posiblemente no encontró los cultivos (papa y tomate) hasta que fue introducido con algunos especímenes silvestres a los jardines botánicos de Nueva York a principios del siglo XIX. Luego fue exportado a Europa, probablemente en tubérculos de papa, en donde a partir de 1840, *P. infestans* apareció en Irlanda, país donde la población había dependido casi exclusivamente del consumo de papa por más de 200 años. El clima de esta región fue ideal para el desarrollo del hongo y en los años 1845-46 hubo una epidemia severa de gota que devastó el cultivo de papa (Arneson, 1998).

Sin embargo, la primera teoría acerca del origen de *P. infestans*, fue propuesta por Berkeley y de Bary, identificaron a los Andes suramericanos como el centro de origen del patógeno, teoría que ha sido retomada por las evidencias científicas a su favor, como son la resistencia al hongo encontrada en especies solanáceas silvestres y cultivadas en la región Andina. A partir de los años 1980's, el programa de tizón tardío de la papa del Centro Internacional de la Papa inició actividades de investigación en los andes suramericanos. Allí se encontró gran cantidad de hospedantes en el Perú,

(Abad, 1997), Ecuador (Ordóñez, 2000) y una gran diversidad y agresividad del patógeno en Colombia, razón por la cual, se consideró este lugar como el segundo sitio de diversidad de *P. infestans*, trasladando al Centro Regional de Investigación “La selva” del ICA, el programa de evaluación de los clones obtenidos por los mejoradores de dicho centro (Jaramillo, 2003).

P. infestans ha migrado desde su “centro de origen” a todos los lugares del mundo donde se cultiva papa y tomate. La primera migración fue limitada pues sólo se dispersó el tipo de apareamiento A1, situación que se mantuvo por 130 años aproximadamente, ya que se limitó únicamente a la reproducción asexual del hongo. Para 1970, ocurrió una nueva migración a Europa por la importación de papa de varios países, en esta ocasión no solo llegaron los tipos A1 y A2, sino variantes más agresivas de ambos tipos, que desplazaron las antiguas poblaciones del oomicete; en pocos años esta nueva población cruzó Europa y Asia llegando hasta Japón (Goodwin *et al*, 1995; Grunwald y Flier, 2005).

2.7 Caracterización del patógeno

Existen marcadores fenotípicos, bioquímicos y moleculares que han posibilitado la identificación de aislamientos de *Phytophthora infestans* distintos en una población. Los marcadores más utilizados para caracterizar las poblaciones de este patógeno han sido la virulencia, tipo de apareamiento, isoenzimas, haplotipos mitocondriales, polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) y repeticiones de secuencias simples o microsatelites (SSR por sus siglas en inglés), además, a la fecha se han desarrollado numerosos estudios basados en la secuenciación de varios genes nucleares o mitocondriales. El uso de marcadores

bioquímicos y moleculares, a diferencia de los morfológicos que se ven muy influidos por las condiciones del medio, no posee tantas limitantes, además permiten hacer evaluaciones aun cuando la planta está en sus primeros estados de desarrollo.

2.7.1 Tipo de apareamiento

El tipo de compatibilidad en *P. infestans* puede realizarse tanto por ausencia de oosporas en cruces con un aislamiento testigo previamente caracterizado como A1, como por la técnica de PCR con iniciadores específicos, la cual puede estar relacionada como un signo o consecuencia de anormalidades estructurales adicionales, que podrían ser responsables de la segregación no mendeliana del tipo de apareamiento (Judelson, 1996). Esta técnica ha sido utilizada por Gilchrist (2001) para la determinación del tipo de apareamiento de aislamientos colombianos de *P. infestans*.

Varios investigadores han evaluado los tipos de apareamiento presentes en diferentes países. Shaw *et al.* (1985), opinan que el tipo de apareamiento A2 pudo haber estado presente, pero no se detectaba por bajas frecuencias en diferentes países por fuera de México durante varios años. García *et al.*, (2000) encontraron al noroeste de México que el tipo de apareamiento predominante en 1994-1995 fue el A2, el cual estaba prácticamente desaparecido en 1996-1997. La presencia de ambos tipos de apareamiento de manera simultánea sólo se observó en unos pocos campos donde crecían simultáneamente papa y tomate.

Spielman *et al.*, (1991) caracterizaron por diferentes juegos de alelos los aislamientos de los países que tenían estrictamente el tipo de apareamiento A1 y los que incluían ambos tipos de apareamiento.

2.7.2. Isoenzimas

Las isoenzimas son variantes de una misma enzima, que comparten un sustrato común, pero que difieren en su movilidad electroforética, es decir comparten la misma función catalítica en el metabolismo celular. Las aloenzimas, son isoenzimas cuyas variantes son codificadas en el mismo locus, son alélicas, por lo tanto son ideales para investigar poblaciones, ya que los métodos analíticos dependen del conocimiento de las frecuencias y distribuciones alélicas (Spielman, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996).

Las isoenzimas se utilizan para identificar la diversidad genética dentro de poblaciones de organismos. Se considera que los patrones de bandas isoenzimáticas son menos complejos que los de proteínas totales y se pueden diferenciar e interpretar más rápidamente, además son estables, codominantes y generalmente están bajo control genético simple (Tooley *et al.*, 1989).

En el estudio de poblaciones normalmente se utilizan enzimas monoméricas o diméricas, ya que las poliméricas, son difíciles de observar en cruces, puede haber más de un locus que codifica para la enzima y no se puede determinar que alelo pertenece a cual locus. En el caso de las enzimas monoméricas, el producto genético es la unidad de la enzima activa, así que las homocigotas presentan una banda y las heterocigotas presentan dos bandas.

En las enzimas diméricas, los productos genéticos iniciales son inactivos. La actividad enzimática solo se presenta, cuando se unen dos productos o subunidades de un solo gen. Las subunidades se combinan al azar, si se presentan dos clases diferentes, como podría ser el caso en heterocigotas, se forman tres clases de moléculas enzimáticas activas: dos homodímeros diferentes y un heterodímero. Así

que las homocigotas tienen una sola banda pero las heterocigotas poseen tres bandas.

Para diferenciar *Phytophthora infestans* se ha presentado buena resolución para las isoenzimas glucosa fosfato isomerasa (*Gpi*) y peptidasa (*Pep*), las cuales tienen control genético simple, con alelos mendelianos, y fueron polimórficas para las poblaciones que se reproducen sexual y asexualmente (Tooley *et al.*, 1989).

Tanto *Gpi* (siete alelos) como *Pep* (cinco alelos), producen patrones de bandas sobre geles típicos de enzimas diméricas y si se cruzan parentales diferentes con una sola banda (homocigota), se obtiene una progenie con tres bandas heterocigotas (Jaramillo, 2003).

2.7.3 Haplotipos mitocondriales

El polimorfismo en la longitud del fragmento de restricción de loci mitocondriales ayuda a conocer eventos de migración. Aparentemente, el DNA mitocondrial es transmitido uniparentalmente y cada genotipo contiene un único haplotipo mitocondrial. Si un genotipo desconocido es introducido en una nueva área, el DNA mitocondrial servirá como un marcador en la progenie clonal. Carter (1990) utilizó la técnica de RFLPs para determinar cuatro haplotipos del DNA mitocondrial (I-a y I-b, II-a y II-b) de 24 aislamientos procedentes de 11 países. En 1992, Goodwin descubrió cuatro haplotipos por la técnica de Southern blot, determinando los haplotipos A, B, C y D entre 173 aislamientos procedentes de México, Perú y Europa. Griffith y Shaw (1998) diseñaron “primers” para la amplificación de PCR, de regiones polimórficas conocidas del genoma mitocondrial de *P. infestans*. La digestión de los productos amplificados con enzimas de restricción, permitió la identificación de los haplotipos previamente

establecidos. El producto del corte P2 con *Msp*1 únicamente identificó los haplotipos I-b y II-a, mientras los haplotipos I-a y II-b fueron diferenciados por la digestión del producto P4 con *Eco* R1. Las digestiones de los productos P1 y P3 dieron resultados similares a los obtenidos con la digestión de P4, pero la amplificación de estos productos fue menor. Por lo tanto los cuatro haplotipos comunes son identificados por amplificar y digerir los productos P2 y P4, cuyo DNA puede ser extraído directamente de los folíolos de papa con pequeñas lesiones de tizón tardío, lo que permite monitorear de manera rápida y eficiente la población de *P. infestans*. Por haplotipo mitocondrial se entiende una repetición de fragmentos de restricción de los productos amplificados con los iniciadores diseñados a partir del DNA mitocondrial.

2.7.4 Inter transcribed spacer (ITS)

Los genes del RNAr de los eucariontes conocidos como DNA ribosomal o DNAr, se encuentran como unidades repetidas que están arregladas en tándem, localizados en sitios del cromosoma conocidos como regiones del organizador nuclear (NORs), conteniendo al menos 3000 copias por célula. Cada unidad repetida consiste en una región transcripta, que tiene a los genes 18S, 5.8S y 28S RNAr, el espacio transcrito interno se conoce como ITS1 e ITS2. Estas regiones de DNA permiten diferenciar especies dentro de un género mediante el análisis de las regiones espaciadoras de los genes del DNA ribosomal, pero no son de utilidad para diferenciar al interior de la especie; pues dentro de un mismo grupo de patógenos por ejemplo, se separan indudablemente *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. phaseoli*, al igual que otras especies provenientes de plantas silvestres pero sí de *P. elicis*, *P. colocacie* y *P. hibernalis* (Guadet *et al.*, 1989; Riethmüller *et al.*, 2002).

Ordoñez *et al.* (1998) determinó, mediante la utilización de la región ITS2 del DNA ribosomal, que aislamientos tomados de lesiones típicas de tizón tardío, que crecían en dos especies silvestres de *Solanum*, en el Ecuador, con tipo de apareamiento A2, pertenecían a *P. infestans*. Utilizaron los iniciadores específicos ITS3 y PINF2 y una muestra de 10 ng de DNA extraída según el procedimiento propuesto por Tooley *et al.* (1997) y encontraron que todos los aislamientos que habían sido ubicados en el tipo de apareamiento A2 amplificaron, confirmando que pertenecían a dicha especie. Posteriormente, utilizaron la región ITS2 clonada del DNAr de un aislamiento, fue secuenciada y luego alineada con otras 14 especies de *Phytophthora* para identificar cualquier diferencia en los nucleótidos, encontrando que sólo difería en dos nucleótidos de la secuencia publicada para *P. infestans*.

2.7.5 Secuenciación de genes nucleares

Los genes nucleares empleados para determinar el origen o las relaciones filogenéticas son los conservados, entre estos podemos citar a los genes que codifican para las proteínas de la familia de la tubulina. Los genes de tubulina tienen un origen muy antiguo, podría esperarse que sus secuencias presentaran una gran divergencia, sin embargo esto sólo es cierto para el extremo C-terminal de las tubulinas α y β , ya que los fragmentos N-terminales están notablemente conservados con variaciones mínimas. Este alto grado de conservación está seguramente impuesto por las limitaciones estructurales del ensamblaje y desensamblaje de microtúbulos (MTs), conjuntamente con las limitaciones impuestas por la asociación de proteínas como las kinesinas y dineínas. Los miembros individuales de la familia de las tubulinas de los distintos órdenes filogenéticos han evolucionado de una manera excepcionalmente

lenta, a una tasa comparable de las histonas o la actina. La alta tasa de conservación dentro de la familia de las tubulinas implica que las propiedades funcionales de estas proteínas imponen unas limitaciones enormes a cualquier diversificación de la secuencia, de manera que las mutaciones sólo pueden acomodarse en unas pocas posiciones sin producir un efecto deletéreo. Por otro lado, una modificación que se haya conservado probablemente sea funcionalmente ventajosa, y por ello estará seguramente relacionada con propiedades específicas de las tubulinas en órdenes diferentes (Chen and Roxby, 1996; Kroon *et al.*, 2004).

Otros genes empleados son los que codifican para las proteínas Ras, estos genes son un conjunto de interruptores-reguladores moleculares muy importantes en una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares que controlan diferentes fenómenos: integridad del citoesqueleto; proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular y la apoptosis (Chen y Roxby, 1996).

2.8. LITERATURA CITADA

- Abad, G.J. de. 1997. *Phytophthora infestans* en la zona Central del Perú: Razas, Patotipos, especialización fisiológica, tipos de compatibilidad, Resistencia de Variedades y Rangos de hospederos. Plant Dis. 81: 682-688.
- Agrios, G. N. 1999. Fitopatología. 2ª edición, Ed. LIMUSA México. pp 64-117 y 310-323.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press. U.S.A 922 p.
- Alarcón, J; Galindo, J. 2001. Plagas y Enfermedades de la Papa. ICA, Boletín de Sanidad. Perú pp 66-74.
- Arneson, P.A. 1998. Tizón En: Biological control. Universidad de Cornell. 85 p.
- Carter, D.A.; Archer, S.A. and Buck, K.W. 1990. Restriction Fragment Length Polymorphisms of Mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans*. Mycological Research. 94: 1123-1128.
- Carrasco, E; Estrada, N, Gabriel, J, Alfaro, G; Larondelle, Y; García, W; 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.
- Chen, Y., Roxby, R. 1996. Characterization of *Phytophthora infestans* gene involved in vesicle transport. Gene 28: 89-94.
- Erwin, D.C. and Ribeiro O.k. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. Minnesota. The American Phytopathological Society U.S.A. 562. p

- Fry, E.W., Goodwin, S.B., Dyer, A.T., Matuszak, J.M., Drenth, A., Tooley, P.W., Sujkowski, L.S., Koh, Y.J., Cohen, B.A., Spielman, L.J., Deahl, K.L., Inglis, D.A. and Sandlan, K.P. 1993. Historical and Recent Migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathways, and Implications. Plant Dis. 77: 653-661.
- Fry EW, Goodwin SB. 1995. Recent migrations of *Phytophthora infestans*. En: Dowley LJ, Bannon E, Cooke RL, Keane T, Andosullivan E, editores. *Phytophthora infestans* 150. Dublin (Irlanda): Boole Press. pp. 89-95.
- 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.
- Gilchrist, E. 2001. Evaluación de la Diversidad Genética y Patogénica de las poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en Antioquia. Phytopathology 93:236-243.
- Gómez-Alpizar, L, I. Carbone and J.B Ristaino. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. Proc. Natl. Acad. Sc 104:3306-3311.
- Goodwin S. B., L. J. Spielman, J. M. Matuszak, S. N. Bergeron and W. E. Fry. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* population in Northern and Central Mexico. Phytopathology 82:955-961.
- Goodwin, S.B., B.A. Cohen and W.E. Fry. 1994, Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. Proc. Natl. Acad. Sc. 91: 11591-11595.

- Goodwin, S.B., Sujkowski, L.S., Dyer, A.T., Fry, B.A. and Fry, W.E. 1995. Direct Detection of Gene Flow and Probable Sexual Reproduction of *Phytophthora infestans* in Northern North America. *Phytopathology*. 85: 473-479.
- Griffith, G.W. and D.S. Shaw. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes are detected after PCR Amplification of DNA from pure cultures or from Host Lesions. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4007-4014.
- Grunwald N, and W.G. Flier. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 171-190.
- Guadet J., J. Julien, J. Francois. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Molecular Biology Evolution* 6:227-242.
- Hold, I. 1991. Surface related host-pathogen interactions in *Phytophthora*. In Lucas, J.A., R.C. Shattock, D.S. Shaw and L.R. Cooke. 1991. *Phytophthora*. Cambridge University Press. 447 p
- 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.
- Jaramillo, V. S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. 138 p.
- Judelson, H.S., Spileman, 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.

- Kamoun, S.; Hraber, 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. <http://www.idealibrary.com> 23 febrero 2011.
- Keen, N.T. 2000. A Century of plant pathology: a retrospective view on understanding host-parasite interactions. *Ann. Rev. Phytopath.* 38:31-48.
- Kroon, L.P., F.T. Bakker, G. B. van den Bosch, P. J. Bonants, W.G. Flier. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41: 766-782.
- Lucas, J.A., R.C. Shattock, D.S. Shaw and L.R. Cooke. 1991. *Phytophthora*. Cambridge University Press. 447 p.
- López, J.B; M.E. Márquez, S. Jaramillo, J.L. Zapata, J.J. Mazo and L.F. Patiño. 1997. Determinación de Razas fisiológicas y Tipo de Apareamiento en aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Revista Latinoamericana de la Papa*. 9: 156-170.
- 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*. Cambridge University Press. New York 447 p
- Ordoñez, M.E., L.J. Erselius, H.R. Hohl, M.P. Ramón, C.D. Smart, A. Velasco, P.J. Oyarzún, R.J. Nelson and G.A. Forbes. 1998. An A2 Population of *Phytophthora infestans* Found on Wild Solanaceous Species in Ecuador is Weakly Pathogenic on Potato and Tomato. *Phytopathology*. 88: 265-271
- Ordoñez, M.E., H.R. Hohl, J.A. Velasco, M.P. Ramón, P.J. Oyarzún, C.D. Smart, W.E. Fry, G.A. Forbes and L.J. Erselius. 2000. A Novel Population of *Phytophthora*,

similar to *Phytophthora infestans* attacks Wild *Solanum* species in Ecuador. *Phytopathology*. 90: 197-202.

Pérez, G., J. Forbes. 2008. Manual Técnico: El Tizón Tardío de la Papa. Centro Internacional De la Papa (CIP) Lima, Perú 39 p.

Riethmüller A., Voglmayr H., Göker M., Weib M., 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.

Shaw, D.S., Fyfe, A.M., Hibberd, P.G. and Abdel-Sattar, M.A. 1985. Occurrence 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.

Smart, C.D.; Sandrock, R. W.; and Fry, R. 2000. Molecular Techniques and Mystery of the Potato Late Blight Pathogen. *Plant-Microbe Interactions*. Vol 5. Edited by Gary Stacey and Noel Keen . 336p. APS (American Phytopathology Society) Press. St. Paul Mn. United States of America. PP: 21-41.

Spielman, J.L., Drenth, A., Davidse, L.C., Sujkowski, L.J., Gu, W., Tooley, P.M. and Fry, W.E. 1991. A Second world-wide Migration and Population Displacement of *Phytophthora infestans* ? *Plant Pathology*. 40: 422-430.

Tooley, P.; Therrien, C. and Ritch, D. 1989: Mating Type, race composition, nuclear DNA content and isozyme analysis of peruvian isolates of *P. infestans*. *Phytopathology* 79: 478-481.

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.

Turkensteen, L. J., Flier, W. G., Wanningen, R., and Mulder, A. 2000. Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. Plant Pathol. 49:688-696.

Wen-Hsiung KO. 1998. Chemical stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora infestans*. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 39: 81-86.

CAPITULO 3

III. DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Phytophthora infestans* (DE BARY) EN CHAPINGO, MEXICO

RESUMEN

En el altiplano central mexicano, el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) presenta alta incidencia, severidad y diversidad genotípica, debido en parte a sus progenies derivadas sexualmente. El objetivo del presente estudio fue evaluar el tipo de apareamiento, el perfil aloenzimático y el haplotipo mitocondrial de 88 aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos del campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, durante 2008, 2009 y 2010. Las muestras se recolectaron por el diseño experimental completamente al azar. Predominó la población homotática (A1A2) con una frecuencia de 0.761, los tipos A1 y A2 con frecuencia de 0.125 y 0.114. Se observó abundancia de genotipos de isoenzimas, se presentaron los alelos 100 y 122 para las Peptidasas (*Pep*), y 86, 90, 100, 111 y 122 para Glucosa fosfato isomerasas (*Gpi*). El genotipo más frecuente fue homotático (A1,A2), *Pep* 100/100 y *Gpi* 86/100. El índice de diversidad genotípica (Shannon) fue 1.8, y el análisis de los resultados indica la presencia de un solo haplotipo mitocondrial Ia. Pocos genotipos se pudieron ubicar con precisión en alguna de las clasificaciones existentes, por lo que se requiere un criterio de clasificación que incorpore a la mayoría de alelos multilocus detectados por aloenzimas y a la condición homotática de acuerdo al tipo de compatibilidad.

Palabras clave adicionales: Haplotipo mitocondrial, isoenzimas, tipo de compatibilidad, tizón tardío.

GENETIC DIVERSITY OF *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, IN CHAPINGO,
MEXICO.

ABSTRACT

In the central highlands of México, late blight (*Phytophthora infestans*) shows a high incidence, severity, and genotypic diversity, mainly due to its sexually derived progenies. Therefore, it is important to characterize its populations. In this study mating type, isoenzymatic profiles and mitochondrial haplotypes of 88 isolates collected in 2008, 2009, and 2010, from the Autonomous University of Chapingo experimental station were evaluated. The homothallic population (A1A2) was predominant, with a frequency of 0.761, A1 was 0.125, and A2 was 0.114. Twenty five genotypes were identified via isoenzymatic profiles, with the alleles 100 and 122 for peptidases (*Pep*), and 86, 90, 100, 11, y 122 for Glucose phosphate isomerase (*Gpi*). The most frequently detected genotype was A1A2; 100/100; 86/100 (mating type; *Pep*; *Gpi*). The genetic diversity index was 1.8 (Shannon), and only the mitochondrial haplotype Ia was identified. Few genotypes could be precisely located in some of the existing classifications; hence, most of them could be considered unique in the area or not present in other regions. Therefore, a new criterion for classification that includes most of the multilocus alleles detected by isoenzymes and the homothallic condition according to the mating type is needed.

Additional key words: Mitochondrial haplotype, isozymes, mating type, late blight.

3.1 INTRODUCCIÓN

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary es un Oomycete perteneciente al grupo Stramenophyla del Reino Cromista, posee una gran plasticidad genética y niveles altos de virulencia sobre diversos cultivos de solanáceas; uno de los cultivos comerciales más afectados mundialmente es la papa (*Solanum tuberosum* L.). Este fitopatógeno es una amenaza para la seguridad alimentaria mundial, ya que es causante de la enfermedad tizón tardío, responsable de la hambruna en Irlanda en el siglo XIX. Esta enfermedad se caracteriza por manchar hojas, tallos, pecíolos y tubérculos de color marrón hasta necrosarlos totalmente y causar la muerte del tejido (Pérez y Forbes, 2008); por tal motivo *P. infestans* es un organismo de los más estudiados en su reproducción, fisiología, y procesos infectivos. Es necesario conocer la diversidad genética de las poblaciones de las regiones infectadas, ya que está relacionada con la eficacia y la eficiencia de los métodos de combate. Entre los métodos para caracterizar su diversidad están los marcadores fenotípicos y genotípicos, los más empleados son los patrones aloenzimáticos de glucosa fosfato isomerasas (GPI) y peptidasas (PEP), el tipo de apareamiento (A1, A2), la sonda RG57 y la evaluación de haplotipos de DNA mitocondrial (DNAm) (Spielman *et al.*, 1991; Goodwin *et al.*, 1992; Goodwin *et al.*, 1995a; Griffith y Shaw, 1998; Gómez-Alpizar *et al.* 2007; Jaimasit y Prakob, 2010).

En el país se ha encontrado la presencia de todos los haplotipos mitocondriales: el **Ia** en los estados de México, Puebla; Coahuila y Sinaloa; el haplotipo **Ila** en Puebla y Coahuila, mientras que el **Iib** sólo en Sinaloa (Goodwin, 1996; Grünwald *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2005). Recientemente Garay *et al.*, (2007) reportaron el haplotipo **Ib** en Tlaxcala, en la parte central de México. *Phytophthora infestans* es un organismo heterotálico, ya que requiere de dos tipos de apareamiento para reproducirse

sexualmente: A1 y A2. Este último estuvo reportado sólo en México hasta fines de 1980. Para 1981 se encontró en Europa, Oriente Medio, Asia y Sur América, especialmente en Venezuela y Colombia, aumentando su importancia debido a su rápida dispersión y alta virulencia, adaptándose a nuevas condiciones ambientales y hospederos (Goodwin *et al.* 1995b; Gilchrist *et al.*, 2009). Así se tiene la hipótesis que México es el centro de origen de *P. infestans* (Mont) de Bary, especialmente porque en la zona centro se ha encontrado la mayor diversidad genotípica a nivel mundial (Goodwin, 1996; Grünwald y Flier, 2005; Grünwald *et al.*, 2001). Esta diversidad se ha estimado con aloenzimas, polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP) y los tipos de compatibilidad (Goodwin, 1996); y ha sido caracterizada ampliamente mediante métodos bioquímicos y moleculares, resultando distintas formas de clasificación. El empleo de estas metodologías ha conducido a determinar que las poblaciones de *P. infestans* están subestructuradas a partir de linajes clonales, los que son frecuentemente denominados por las iniciales del país donde fueron encontrados y por un sufijo numérico que representa linajes derivados del original. Así por ejemplo, se considera que los aislamientos que participaron en la primera migración masiva de *P. infestans* desde México hacia Europa y EEUU, pertenecen al linaje US-1, mientras que aquellos reportados en Ecuador se denominan EC-1, EC-2 y EC-3 (Adler *et al.* 2004).

Debido a la relevancia del patógeno y a la necesidad de relacionar criterios de clasificación, el objetivo de esta investigación fue determinar la variabilidad genética de *Phytophthora infestans* en poblaciones aisladas de clones de papa en Chapingo, México y establecer relación con otras clasificaciones del patógeno.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Aislamiento del patógeno

Se recolectaron follaje y tallos con lesiones simples de clones de papa con síntomas de tizón en lotes experimentales del campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México, durante los ciclos de cultivo de 2008, 2009 y 2010. Los aislamientos de *P. infestans* fueron obtenidos de esos tejidos; en cajas Petri de 10 cm de diámetro se colocaron los tejidos enfermos sobre rodajas de papa sana (var. Alpha) desinfestada con hipoclorito de sodio al 2 % (v/v), con el fin de permitir el crecimiento de micelio, a temperatura ambiente. Al tercer día se observó el crecimiento de micelio al microscopio para confirmar la presencia del patógeno mediante preparaciones fijas. El micelio purificado se transfirió a medio sólido agar- centeno y se incubó a 21°C (Grünwald, *et al.*, 2001).

3.2.2 Tipo de compatibilidad

El tipo de compatibilidad se determinó cruzando los aislamientos de *P. infestans* con la cepa tipo de compatibilidad conocida (A1, A2); cada aislamiento creció en medio agar-centeno hacia un lado de la caja Petri, en la misma caja del lado contrario se colocó la cepa tipo y se incubaron a 21°C. Después de 2 a 3 semanas, la presencia de oosporas en las cajas Petri con el tipo A1 identificó al aislamiento desconocido como A2 y la presencia de oosporas en las cajas Petri con el tipo A2 indicó que el aislamiento fue A1. Si el mismo aislamiento formaba oosporas con ambas cepas tipo se consideró homotático (Gilchrist, *et al.*, 2009).

3.2.3 Patrones Aloenzimáticos

La determinación de genotipos por aloenzimas se realizó conforme al método descrito por Goodwin *et al.* (1995a). Se transfirió micelio a un tubo de microcentrífuga

que contuvo 30 µL de agua destilada estéril y se maceró con una broca de plástico. Después de reposar 5 min se tomaron 10 µL para colocarlos en placas de acetato de celulosa (Titan III, Helena Laboratories). La electroforesis se llevo a cabo en amortiguador Tris- Glicina (pH 8.5), el revelado de cada enzima se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Hebert y Beaton (1993). Para determinar la diversidad genotípica se empleó el índice de Shannon-Wiener. Éste se basa principalmente en el concepto de equidad. Adquiere valores entre cero, cuando hay una sola especie y el logaritmo de S, cuando todas las especies están representadas por el mismo número de individuos (Moreno, 2001).

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

donde :

p_i = abundancia proporcional de la especie i , es decir, el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra.

3.2.4 Extracción de DNA

Se llevó a cabo siguiendo dos métodos de extracción: el primero fue el propuesto por Griffith y Shaw (1998). Se utilizó el micelio crecido durante 10 días de cada aislamiento, se maceró con 800 µL de amortiguador de extracción (NaCl 100 mM, Tris-HCl pH8 100mM, NaCl 1.4 M, CTAB 2 %, EDTA pH 8 20 mM), se incubó a 65°C durante 1 h, se adicionaron 600 µL de cloroformo saturado con agua, la mezcla agitó por inversión durante 15 s, se centrifugó a 15700 xg durante 12 min, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se adicionó RNAsa 10µg/ml. Posteriormente se incubaron durante 1 h a 37 °C, se adicionaron 400 µL de isopropanol incubándose a - 20 °C durante 20 min, se centrifugó a 15700 xg durante 12 min, se decantó el

sobrenadante y se lavó el sedimento con 500 µL de etanol a 70 % (v/v), se volvió a centrifugar eliminándose el sobrenadante y el precipitado se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM de EDTA pH 8) y se guardó a -20 °C.

En el método utilizado por Goodwin *et al.* (1992), el micelio crecido en cinco cajas Petri sobre medio agar-centeno se maceró con 900 µL de amortiguador de extracción (EDTA 0.5 M, Tris 1 m pH8, NaCl 1.4 M, SDS 20 % y β- mercaptoetanol). Después de incubarse a 65 °C durante 1 hora, se adicionaron 450 µL de acetato de amonio 7.5 M y la mezcla se mantuvo en hielo durante 20 min. Se centrifugó a 14,000 rpm 10 minutos, el sobrenadante se transfirió y se incorporaron 800 µL de isopropanol para precipitar en hielo durante 30 minutos, después se centrifugó a la misma velocidad por 5 min, se decantó el isopropanol y el precipitado se lavó con etanol a 70 % (v/v) y la pastilla se secó invirtiendo el tubo a temperatura ambiente. Se resuspendió el pellet con 450 µL de amortiguador TE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 0.5 M) y 1 µL de RNAsa A, se dejó reposar toda la noche a 4 °C. Al otro día se adicionaron 450 µL de la mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 14 000 rpm 5 minutos, el sobrenadante se precipitó con la adición de 45 µL de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol a 95 % (v/v) durante 1 hora, posteriormente se centrifugó la mezcla a la misma velocidad durante 5 min y el precipitado se resuspendió en 100 µL de amortiguador TE (pH 7.5).

3.2.5. Haplotipos mitocondriales

Para llevar a cabo la determinación de haplotipos se realizaron las amplificaciones de los iniciadores propuestos por Griffith y Shaw (1998): P1 (forward 5'-GCAATGGGTAAATCGGCTCAA-3', reverse 5'- AAACCAT AAGGACCACACAT-3');

P2 (Forward 5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT-3'; Reverse 5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3'); P3 (Forward 5'-ATGGTAGA GCGTGGGAATCAT-3', Reverse 5'-AATACCGCCTTTGGGTCCATT-3') y P4 (5'- TGGTCATCCAGAGGTTTATGT-3') (Integrated DNA Technologies USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: dNTP's 200µM, MgCl₂ 2.75 mM, 10 picomoles de cada iniciador, Albúmina de suero de bovino (BSA) 160 µg ml⁻¹, Amortiguador de PCR 1x, Go Taq DNA Polimerasa 1U (Promega), DNA 20 ng en un volumen final de 25 µL; el programa de PCR fue un ciclo a 94 °C durante 1.5 min seguido de 35 ciclos de 94 °C 40 s, 55 °C 60 s, 72 °C 90 s con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos (Applied Biosystems 9700). Se visualizaron los amplicones en geles de agarosa a 1.2 % (p/v), amortiguador de corrida Tris-HCl-ácido bórico- EDTA (TAE) a 90 V durante 90 min, teñidos con bromuro de etidio. Para la digestión de cada amplificado se tomaron 4 µL del producto de PCR siguiendo las indicaciones de la empresa (Promega). Los productos de P1 se digirieron con *CfoI* (Promega) durante 1 h, el fragmento P2 con *MspI* (Promega) durante 16 horas y los fragmentos obtenidos de P3 y P4 con *EcoRI* (Promega) durante 1 h, posteriormente se visualizaron en geles de agarosa a 1.8 % (p/v) en electroforesis con amortiguador de corrida tris-borato- EDTA (TBE) a 50 V durante 90 min; las imágenes fueron foto documentadas empleando el programa Quantity One (BioRad). Para el caso del fragmento P2, la digestión se visualizó en gel de poliacrilamida al 8 % (p/v) y fue teñido con nitrato de plata (0.2% p/v)

3.3 RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.1 Aislamiento del patógeno

Se obtuvieron 88 aislamientos en los tres años (Cuadro 1), los cuales presentaron características morfológicas como micelio cenocítico, hialino, presencia de esporangios ovoides a limoniformes, ahusados en la base con un pedicelo menor a 3 μm semipapilados con paredes delgadas, además la formación de oosporas características de *P. infestans* (Jaramillo, 2003; Pérez y Forbes, 2008; Jaimasit y Prakob, 2010). No se observaron diferencias entre los aislamientos de hoja y tallo en el ciclo 2008 en ninguna de las pruebas realizadas, por lo que para los siguientes ciclos solo se utilizó follaje.

Cuadro 1. Aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de papa del campo experimental Chapingo, Méx.

Año	Muestra	Número de aislamientos
2008	Tallo	6
2008	Hoja	26
2009	Hoja	40
2010	Hoja	16
Total		88

3.3.2 Tipo de compatibilidad

Se presentaron los dos tipos de compatibilidad de *P. infestans*: A1 con una frecuencia de 0.125 y A2 frecuencia de 0.114, guardando la proporción 1:1. Los aislamientos homotáticos A1/A2, se presentaron en una frecuencia de 0.761. Estos resultados difieren a lo reportado anteriormente por otros autores en donde la frecuencia de aislamientos homotáticos es menor, como el caso de los aislamientos del valle de Toluca en donde predominan los A1 y los A2 en la proporción 1:1 sin ningún reporte de los homotáticos (Grünwald *et al.*, 2001; Gómez Alpizar *et al.*, 2007);

o los aislamientos de Michoacán en donde su frecuencia fue de 0.038 (Fernández et al., 2005). Sin embargo, en este estudio se apreció un desplazamiento de la población heterotática por la homotática, la cual se caracteriza por ser altamente virulenta y variable, lo que le ha permitido adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Silva et al., 2009). La condición homotática puede proveer una ventaja selectiva en poblaciones colonizantes, ya que éstas pueden iniciar la reproducción sexual por sí mismas; a su vez se presenta una alta endogamia, ya que se reduce la heterocigosidad a la mitad en cada generación. Estudios al respecto, señalan que en la séptima generación de reproducción homotática sólo permanece el 1% de la heterocigosidad original (Goodwin, 1997), en esta investigación no se conoce la causa de la presencia de aislamientos homotáticos, una posibilidad puede ser que las plantas cultivadas en el campo experimental Chapingo han sido seleccionadas y en su mayoría son clones lo que ha reducido su forma de reproducción sexual por tanto la heterocigosidad.

3.3.3. Patrones Aloenzimáticos

Se observó una gran cantidad de genotipos de isoenzimas en los aislamientos, identificándose los alelos 92, 100 y 122 para las *Peptidasas* (*Pep*), y los alelos 86, 90, 100, 111 y 122 para *Glucosa fosfato isomerasa* (*Gpi*). El genotipo más frecuente resultó el homotático (A1A2) con bandas 100/100 para *Pep* y bandas 86/100 para *Gpi*. Los genotipos obtenidos se describieron en términos de la movilidad relativa de las bandas en un campo eléctrico, donde el alelo más común fue el que presentó la movilidad de 100 (Hernández y Gómez, 2005). Un total de 24 genotipos multilocus fueron identificados al combinar el tipo de apareamiento junto con los alelos mostrados por las isoenzimas. La incidencia de aislamientos homotáticos muy probablemente se

debe a que la mayoría de plantas utilizadas son clones seleccionados y que en la zona de estudio no se presenta cultivo de papa de manera natural, por lo que el patógeno pudo desarrollar la condición homotática para asegurar su forma de reproducción sexual. Pese a que la mayoría de los aislamientos son homotáticos, la relación 1:1 de los tipos de compatibilidad A1 y A2 (heterotáticos) se mantiene constante y la combinación de alelos aloenzimáticos es altamente diversa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Genotipos multilocus de *P. infestans* de acuerdo a tipo de compatibilidad y perfil de aloenzimas *Pep* y *Gpi*

Aislamiento	Año	TC	Pep	Gpi	Aislamiento	Año	TC	Pep	Gpi
1	2008	A1, A2	100/100	86/100/122	45	2009	A1,A2	100/100	100/100
2	2008	A1,A2	100/100	86/100/122	46	2009	A1,A2	100/100	86/111
3	2008	A1,A2	100/100	86/100/122	47	2009	A1,A2	100/122	86/100/122
4	2008	A1,A2	100/100	86/100	48	2009	A2	100/100	100/111/122
5	2008	A1,A2	100/100	86/100	49	2009	A2	100/100	86/122
6	2008	A1,A2	100/100	86/100	50	2009	A1,A2	100/100	90/100
7	2008	A1,A2	100/100	86/100	51	2009	A1,A2	100/100	86/100/122
8	2008	A1,A2	100/100	100/122	52	2009	A2	100/122	86/122
9	2008	A1,A2	100/100	86/100	53	2009	A1	100/100	86/122
10	2008	A1,A2	100/100	86/100	54	2009	A2	100/122	86/100/122
11	2008	A1,A2	100/100	86/100/122	55	2009	A1,A2	100/100	86/100/122
12	2008	A1,A2	100/100	86/122	56	2009	A1,A2	100/100	86/100/111
13	2008	A1,A2	100/100	86/100	57	2009	A1	100/100	86/111
14	2008	A1,A2	100/100	86/100	58	2009	A1	100/100	86/100/111
15	2008	A1,A2	100/100	86/100	59	2009	A1	100/100	86/100
16	2008	A1,A2	100/100	86/100	60	2009	A2	100/100	86/100
17	2008	A1,A2	100/100	86/100	61	2009	A1,A2	100/122	86/100
18	2008	A1,A2	100/100	86/100	62	2009	A1,A2	100/100	86/100
19	2008	A1,A2	100/100	86/100	63	2009	A1,A2	100/100	100/100
20	2008	A1,A2	100/100	86/100	64	2009	A1,A2	100/122	86/100/111
21	2008	A1,A2	100/100	90/100	65	2009	A1,A2	100/100	86/100/111
22	2008	A1,A2	100/100	86/100/122	66	2009	A1,A2	100/100	100/122
23	2008	A1,A2	100/100	86/100/122	67	2009	A1,A2	100/100	90/100
24	2008	A1,A2	100/100	86/111	68	2009	A1,A2	100/100	86/100/111
25	2008	A1,A2	100/100	86/100/111	69	2009	A1	100/100	86/100
26	2008	A1,A2	100/100	86/100	70	2009	A1	100/100	100/111/122
27	2008	A1,A2	100/100	86/100	71	2009	A1	100/100	86/111
28	2008	A1,A2	100/100	86/100/122	72	2009	A1	100/100	100/111/122
29	2008	A1,A2	100/100	86/100	73	2010	A1,A2	92/100	100/122
30	2008	A1,A2	100/100	86/100	74	2010	A1,A2	92/100	100/122
31	2008	A1,A2	100/100	86/100/111	75	2010	A1,A2	100/100	100/100
32	2008	A1,A2	100/100	86/100/122	76	2010	A1,A2	100/100	100/100
33	2009	A1	100/100	86/111	77	2010	A1,A2	100/100	100/100
34	2009	A1	100/100	100/111/122	78	2010	A1,A2	100/100	100/100
35	2009	A2	100/100	86/122	79	2010	A1,A2	100/100	100/100
36	2009	A2	100/100	86/100	80	2010	A1,A2	100/100	100/100
37	2009	A2	100/100	100/122	81	2010	A1,A2	100/100	100/100
38	2009	A2	100/100	86/100	82	2010	A1,A2	100/100	100/100
39	2009	A2	100/100	86/100	83	2010	A1	92/100	100/100

40	2009	A1,A2	100/100	86/100/122	84	2010	A1,A2	100/100	100/122
41	2009	A1,A2	100/100	86/100/122	85	2010	A1,A2	100/100	100/122
42	2009	A1,A2	100/122	86/100/122	86	2010	A2	100/100	100/122
43	2009	A1,A2	100/122	86/100/122	87	2010	A1,A2	100/100	100/122
44	2009	A1,A2	100/100	90/100	88	2010	A1,A2	92/100	100/122

TC= tipo de apareamiento *Pep*= peptidasa *Gpi*= glucosa fosfato isomerasa

De los 24 genotipos detectados sólo algunos han sido previamente reportados por distintos autores para la región del Valle de México para los tipos A1 y A2, esto concuerda con lo reportado por Lozoya *et al.*, 2005 donde menciona que en el Valle de Toluca se presenta una gran diversidad genética, casi cada aislamiento es único (Godwin *et al.*, 1992a) o al menos uno de cada diez (Flier *et al.*, 2003); sin embargo para los aislamientos homotáticos no se han presentado reporte de los mismos, sólo el genotipo *Gpi* 100/100 y *Pep* 100/100 ha sido reportado en Saltillo, Coahuila (Gavino y Fry, 2002) el *Gpi* 100/100 en Polonia y *Gpi* 90/100 en Holanda.

Ninguno de los genotipos detectados se puede ajustar a las clasificaciones actuales del patógeno, pese a que muchos perfiles detectados han sido previamente reportados. La diversidad genotípica calculada para los aislamientos de Chapingo, usando el índice de Shannon fue de 1.8, lo que muestra una gran diversidad genética, aunque es un valor menor a lo reportado para el centro de México por Grünwald *et al.* en el 2001, esta disminución se explica con el carácter homotático de índole clonal que presentaron la mayoría de los aislamientos, sin embargo la diversidad fue mayor al 0.92 reportado para Chapingo por Goodwin en 1996, lo que constata lo afirmado por Gilchrist *et al.*, (2009) quienes señalan que conforme transcurre el tiempo aumenta la diversidad en las poblaciones del patógeno. El alelo 122 de *Gpi* no ha sido reportado por otros investigadores fuera de México, sólo hay un reporte en Estados Unidos (Goodwin *et al.*, 1995b), en México es un alelo que se ha reportado tanto en

aislamientos heterotáticos como homotáticos (Grünwald *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2005; Lozoya *et al.*, 2005).

Por su parte el genotipo A1,A2 90/100 para *Gpi* fue reportado en Polonia, el genotipo A1,A2 100/100 *Gpi* y 100/100 *Pep* fue descrito para Saltillo, Coahuila, mientras que el genotipo A1 86/100, 100/100 se identificó en Canadá y Perú, todos ellos durante los años 1980-1990 (Gavino y Fry, 2002).

La diversidad genética observada en este estudio constata lo reportado para la región central de México, en donde predomina la reproducción sexual del patógeno, se observó que las poblaciones de *P. infestans* presentaron gran heterogeneidad, habiéndose detectado más veinte genotipos en el campo experimental Chapingo, resultados parecidos a los quince genotipos diferentes a partir de 33 aislamientos de un solo campo de papa reportado por Matuszak *et al.*, en 1994.

De los genotipos identificados en este trabajo, se puede asociar el genotipo A1 86/100 *Gpi*, 100/100 *Pep* con el US-1; el genotipo A1 100/100, 92/100 se asoció con el US-5, (Gavino y Fry, 2002; Wangsomboondee *et al.*, 2002) y con US-6 (Forbes *et al.*, 1998). La diferenciación entre estos se basa en fragmentos de restricción (RFLP) y el genotipo A2 86/100, 100/100 con el CA-3, otros genotipos tipo A2 se pueden asociar con el US-14 y US-8 (Goodwin *et al.*, 1998).

Sin embargo, como se observa en el cuadro 3, la mayoría de genotipos no se integran a las clasificaciones actuales del patógeno, ya que tanto el sistema de clasificación norteamericano “US” como otros sistemas sólo integran a genotipos heterotáticos y aunque muchos autores han reportado datos de genotipos homotáticos en México en la región central, Michoacán y en el norte en Saltillo, fuera de México se han reportado en países como Polonia y Holanda durante la década de 80 y 90's

(Gavino y Fry, 2002, Fernández *et al.* 2005), pese a ello no hay un criterio de clasificación establecido para tales aislamientos.

3.3.4 Extracción de DNA.

De los dos métodos empleados, se obtuvieron mejores resultados en cuanto a calidad y cantidad con el método descrito por Griffith y Shaw (1998), ya que se extrajo desde 140 hasta 400 ng/ μ L; con una calidad de 1.7 hasta 1.9 (Abs 260/280). Por el contrario el método de Goodwin *et al.* (1992) presentó menor cantidad de DNA extraído desde 11 hasta 200 ng/ μ L, y la calidad varió de 1.4 hasta 1.8 (Abs 260/280).

Cuadro 3. Frecuencia de los genotipos de *Phytophthora infestans* identificados de acuerdo con el tipo de compatibilidad y aloenzimas *Pep* y *Gpi*.

Genotipo	TC	<i>Pep</i>	<i>Gpi</i>	N° de aislamientos	Frecuencia	Genotipo en otras clasificaciones
1	A1	100/100	86/111	3	0.034	-
2	A1	100/100	100/111/122	3	0.034	-
3	A1	100/100	86/122	1	0.011	-
4	A1	100/100	86/100/111	1	0.011	-
5	A1	100/100	86/100	2	0.024	US-1
6	A1	92/100	100/100	1	0.011	US-5, US-6
7	A2	100/100	86/122	2	0.024	-
8	A2	100/100	86/100	4	0.045	CA-3
9	A2	100/100	100/122	2	0.024	US-14
10	A2	100/100	100/111/122	1	0.011	US-8
11	A2	100/122	86/100/122	1	0.011	-
12	A2	100/122	86/122	1	0.011	-
13	A1,A2	100/100	100/122	5	0.057	-
14	A1,A2	100/100	100/100	10	0.113	PE-3
15	A1,A2	100/100	86/100/111	5	0.057	-
16	A1,A2	100/100	86/100/122	12	0.136	-
17	A1,A2	100/100	86/100	19	0.216	-
18	A1,A2	100/100	86/111	2	0.024	-
19	A1,A2	100/100	86/122	1	0.011	-
20	A1,A2	100/100	90/100	4	0.045	-
21	A1,A2	100/122	86/100/122	3	0.034	-
22	A1,A2	100/122	86/100	1	0.011	-
23	A1,A2	100/122	86/100/111	1	0.011	-
24	A1,A2	92/100	100/122	3	0.034	-

TC= tipo de apareamiento *Pep*= peptidasa *Gpi*= glucosa fosfato isomerasa

Así mismo se presentaron mejores amplicones con el DNA obtenido con el primer método, de manera que en los estudios posteriores el DNA se extrajo con el método de Griffith y Shaw.

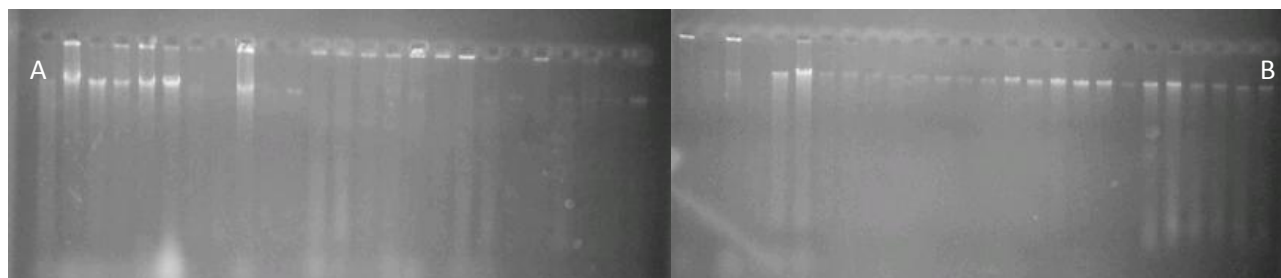


Figura 1. Extracción de DNA: A Método de Goodwin *et al.*, B. Método Griffith y Shaw

3.3.5 Haplotipos mitocondriales

Para los iniciadores P1 se obtuvo una amplificación monomórfica para todas las muestras analizadas de *P. infestans*, como resultado se obtuvo el fragmento de 1118 pb (Figura 4 A). Para realizar la digestión del producto de P1 se empleó la enzima *Hha* I, el tamaño de los fragmentos fue de 211pb y 907 pb (Figura 4 B), estos fragmentos fueron similares a lo reportado por Griffith y Shaw (1998) por lo que se asoció con el haplotipo **Ia** o **Ib**.

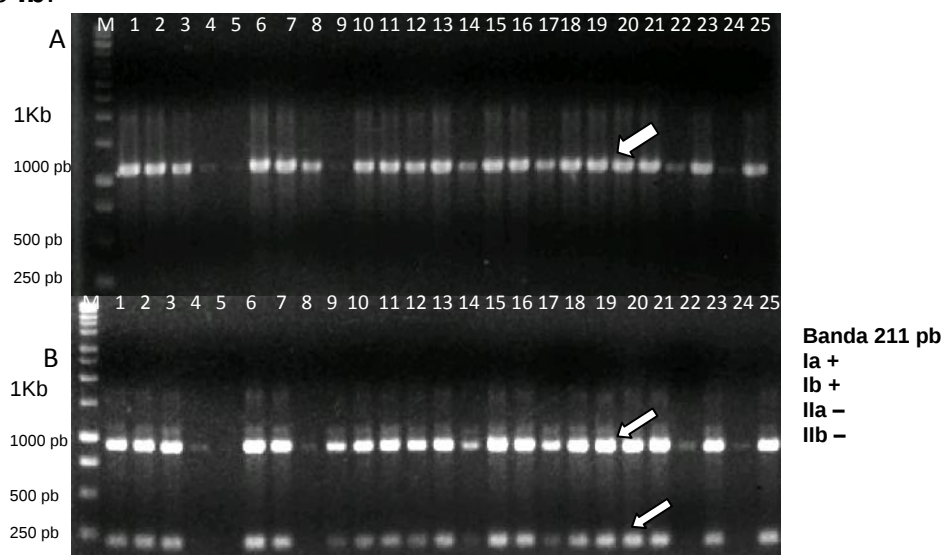


Figura 2. Amplificación y digestión del fragmento P1 (23737-24854 genoma mitocondrial).

Se presentaron dos bandas para los iniciadores P2 (F2R2), una claramente definida de 1070 pb, y otra poca intensa de 750 pb (Figura 5 A). Se realizó la digestión del fragmento de 1070 pb con el empleo de la enzima de restricción *Msp* I y se obtuvieron los fragmentos de 350, 641 y 850 pb (Figura 5 B) lo que indicó una relación con el haplotipo **la** (Botez *et al.*, 2007; Griffith y Shaw, 1998). Para lograr una mejor resolución de fragmentos de digestión se realizó un gel de poliacrilamida en donde se constataron los tres fragmentos antes señalados (Figura 5 C).

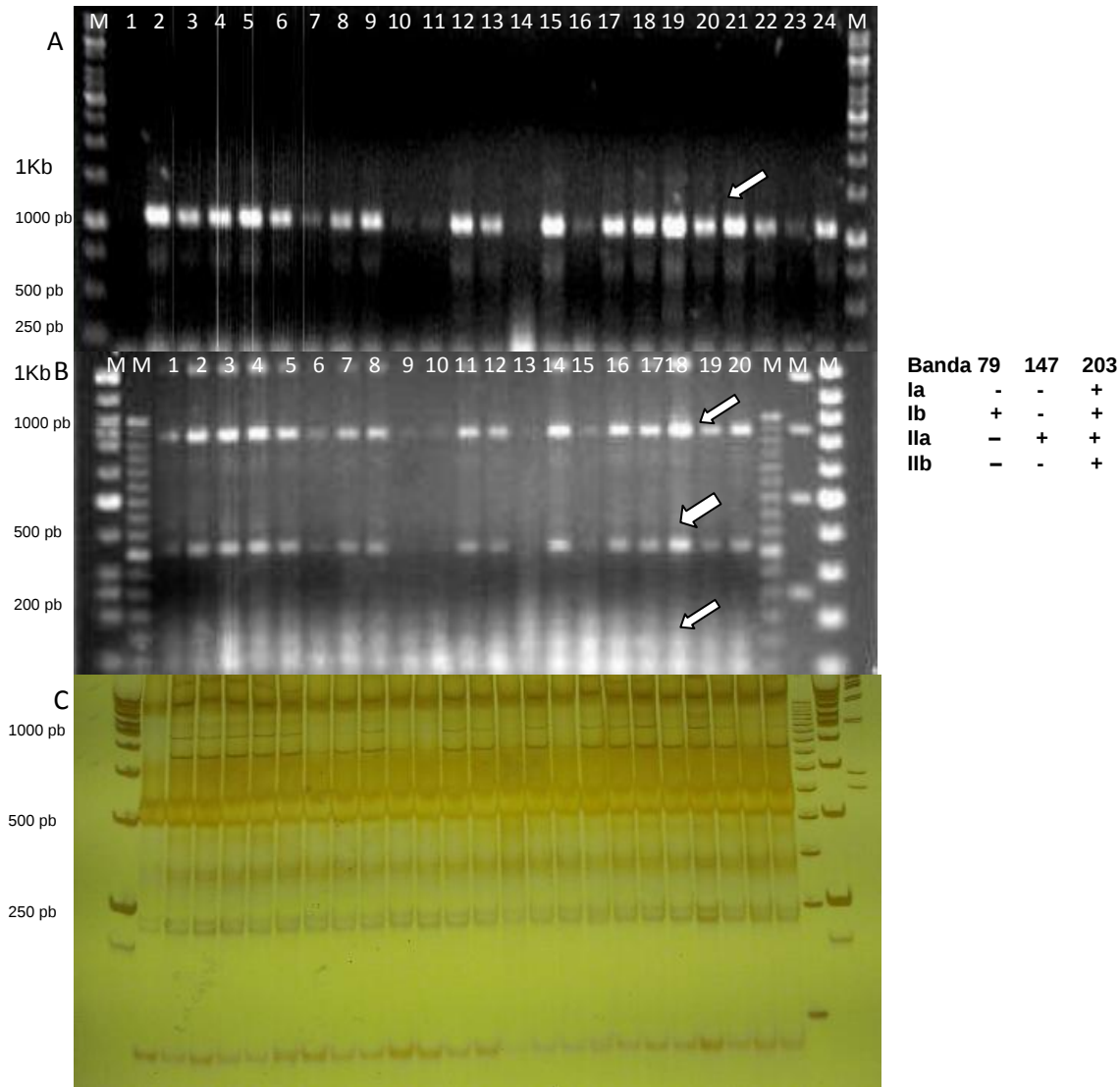


Figura 3. Amplificación y digestión del fragmento P2 (13619-14688 genoma mitocondrial) en geles de agarosa 2 % (A, B) y en gel de acrilamida 8 % (C)

La amplificación del producto de P3 (F3R3) también fue monomórfica en todas las muestras de *P. infestans*, el tamaño del producto amplificado fue de 1308 pb (Figura 6 A). Para la digestión de este producto se utilizó la enzima *Eco* RI y se obtuvieron bandas de 230 pb y 1078 pb (Figura 6 B), las que se asociaron a los haplotipos **Ia** o **Ib**.

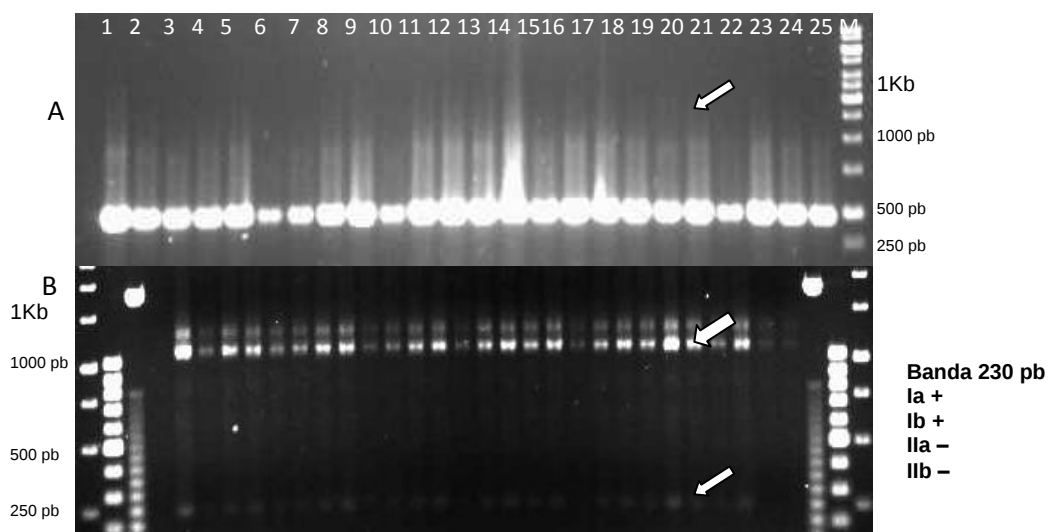


Figura 4. Amplificación y digestión del fragmento P3 (gen *rpl14*, *rpl15* 2892-4199 genoma mitocondrial)

Por último la amplificación del fragmento P4 (F4R4) fue de 964 pb (Figura 7), se empleó la enzima *Eco* RI para realizar la digestión de la cual resultaron cuatro fragmentos de distintos tamaños 209 pb, 394 pb, 750 pb y 800 (Figura 8); siendo el primero característico del haplotipo Ia.

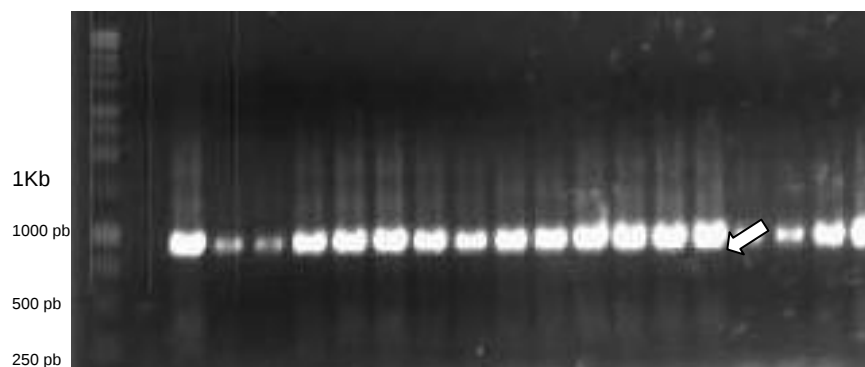


Figura 5. Amplificación del fragmento P4 (gen *cox1* 9329-10292 genoma mitocondrial)

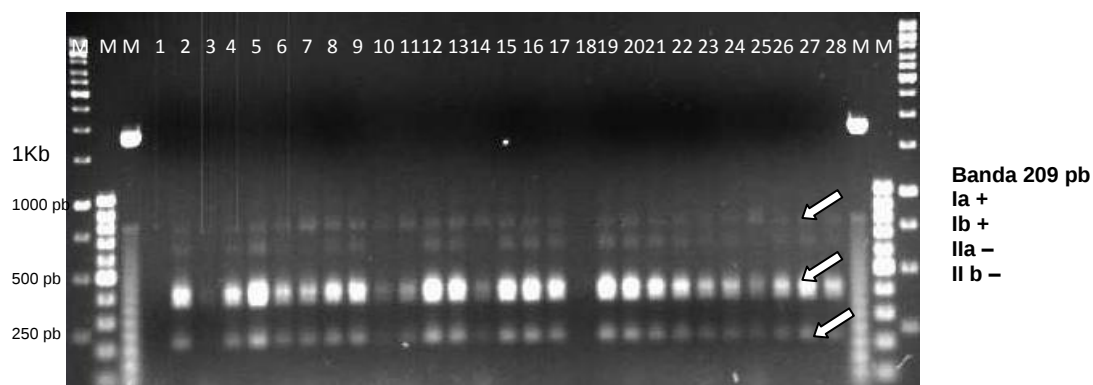


Figura 6. Digestión del fragmento P4 (gen *cox1* 9329-10292 genoma mitocondrial)

Por tanto el haplotipo determinado analizando los patrones de restricción de los cuatro fragmentos resulto ser el **Ia**, ya reportado para el centro de México por distintos autores (Flier *et al.*, 2003; Gavino y Fry, 2002). Este haplotipo está relacionado con el linaje EC-3 y el tipo de apareamiento A1 y A2 (Adler *et al.* 2004; Gavino y Fry, 2002) y con el linaje EC-1 (Silva *et al.*, 2009), sin embargo aquí se presentó tanto para los tipos A1, A2 como para homotáticos (A1/A2) con distintos genotipos aloenzimáticos.

Los resultados obtenidos permiten identificar las variantes que pueden presentarse en la población del patógeno, lo cual puede servir para diseñar estrategias de manejo y control en la región. Además se evidenció la necesidad de establecer criterios de clasificación del patógeno que puedan ubicar a distintos genotipos detectados en este trabajo y a los aislamientos homotáticos, ya que los sistemas actuales (US, EC, CA) no los incorporan.

3.4 CONCLUSIONES

La población de *Phytophthora infestans* presenta diversidad genética de 1.8 en la zona de Chapingo, México, correspondiente a 24 genotipos de aloenzimas, con el haplotipo mitocondrial Ia. La alta frecuencia de homotalismo impidió el establecimiento de una relación de las poblaciones estudiadas con clasificaciones establecidas, ya que estas están basadas en algún grupo de compatibilidad ya sea A1 o A2 pero no en genotipos homotáticos.

3. 5 LITERATURA CITADA

- Adler N.F, L.J. Erselius, M.G. Chacón, W.G Flier, M.E. Ordóñez, L. Kroon and G.A. Forbes 2004. Genetic diversity of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador provides new insight into the origin of this important plant pathogen. *Phytopathology* 94:154-162.
- Botez C., V. Florian, I. Oroian and M. Lecaci 2007. Analysis of Genetic Variability at Mitochondrial DNA Level in some Roumanian *Phytophthora infestans* Accessions. *Bulletin USAMV-CN*, 63: 127-132.
- Fernández P. S. P., A. G. Rodríguez, D. C. R. Belmar, A. K. Sturbaum, W. Flier y H. Lozoya S.2005. Caracterización de Aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary provenientes de Michoacán, México. *Rev. Mex. de Fitopatología* 23:191-197.
- Flier, W. G., N.J. Grünwald, L.P.N. Kroon, A. K. Sturbaum, T.B.M. van den Bosh, E. Garay, H. Lozoya, W.E. Fry, and L.J. Turkensteen, 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Touca Valley of Central Mexico suggests

genetics differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology* 93: 382-390.

Forbes, G., S.B. Goodwin, A. Drenth, P. Oyarzun, M. E. Ordoñez and W.E. Fry, 1998. A Global Marker Database for *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 82:811-817.

Garay, S. E., P. S. Fernández, A. G. Rodríguez, W. G. Flier, H. Lozoya S., R.I. Rojas, M., E. M. Goss and N. J. Grünwald 2007. First report of haplotype I-b of *Phytophthora infestans* in Central Mexico. *Plant Dis.* 91:909.

Gavino, P. D. and W. E. Fry. 2002. Diversity in and evidence for selection on the mitochondrial genome of *Phytophthora infestans*. *Mycologia* 94: 781-793.

Gilchrist, R. E., V. S. Jaramillo, K. L.A. Afanador, and I.R.E. Arango 2009. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Antioquia, Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr.* 62:5031-5037.

Gómez-Alpizar, L, I. Carbone and J.B Ristaino. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *PNAS* 104:3306-3311.

Goodwin S. B. 1996. Origin and Ecology of *Phytophthora infestans*. *Rev. Mex. de Fitopatología* 14:143-147.

Goodwin, S. B. 1997. The Population Genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87: 462-473.

- Goodwin, S. B., L. J. Spielman, J. M. Matuszak, S. N. Bergeron and W. E. Fry 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central México. *Phytopathology* 82:1224-1227.
- Goodwin, S. B., L.S. Sujkowski and W.E. Fry. 1995a. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of potato late blight disease fungus. *Phytopathology* 85: 669-676.
- Goodwin, S. B., L.S. Sujkowski, A.T. Dyer, B.A. Fry and W.E. Fry. 1995b. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in North America. *Phytopathology* 85: 473-479.
- Goodwin, S.B., C.D. Smart, R.W. Sandrock, K.L. Deahl, Z.K. Punja, and W.E. Fry 1998. Genetic Change within Populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: Role of Migration and Recombination. *Phytopathology* 88:939-949.
- Griffith G. W. and D.S. Shaw 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4007-4014.
- Grünwald, N. J. and W. G. Flier. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 171-190.
- 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.

Hebert, P. D. and J.M. Beaton. 1993. Methodologies for Alloenzyme Analysis using Cellulose Acetate Electrophoresis. A practical handbook. Helena Laboratories. Guelph, Ontario. 32 p.

Hernández G. K. y I G. Gómez 2005. Aplicación de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en el Estudio de Poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary causante del Tizón Tardío en papa y Tomate. *Fitosanidad* 9:39-50.

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.

Jaramillo, V. S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans*. Univ. Nacional de Colombia. Fac. de Ciencias agropecuarias 137p.

Lozoya S. H., G. L. Guzmán, P. S. Fernández, N. J. Grünwald and E. McElhinny 2005. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. I. Host Pathogen specificity and resistance components. *Agrociencia* 40: 205-217.

Matuszak J.M. E.J. Fernandez, M. Villareal, G and W.E. Fry. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distributions and dynamics. *Plant Dis.* 78: 911-916.

Moreno, E. C. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T Manuales y Tesis SEA, vol 1 Zaragoza, España. 84p.

Pérez W. y G. Forbes, 2008. Manual Técnico. El Tizón Tardío de la Papa. CIP. Lima, Perú. 39 p

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.

Spielman L. J., A. Drenth, L.C. Davidse, L. J. Sujkowski, W. Gu, P.W. Tooley and W.E. Fry 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 40:422-430.

Wangsomboondee, T., C. T. Groves, P.B. Shoemaker, M.A. Cubeta and J.B. Ristaino. 2002. *Phytophthora infestans* Populations from Tomato and Potato in North Carolina Differ in Genetic Diversity and Structure. *Phytopathology* 92: 1189-1195.

CAPITULO 4

IV. Análisis de divergencia de las secuencias de las regiones de los genes nucleares

β -tubulina, *Ras*, Intrón *Ras* e ITS del DNA ribosomal y en aislamientos de

Phytophthora infestans en Chapingo, México.

RESUMEN

Existen dos teorías acerca del origen de *Phytophthora infestans*: 1) Origen Andino basada en la observación y descripción del patógeno desde el siglo XVI en Sudamérica, y recientemente, mediante estudio molecular de las poblaciones aisladas de los Andes (Perú, Ecuador), las cuales están asociadas con dos linajes cercanos a *Anarrhichomenum* (ancestro de *P. infestans*). 2) Origen del Centro de México, sustentada por la presencia de la forma sexual del patógeno, A1 y A2 en igual frecuencia, la detección de todos los alelos enzimáticos conocidos y la mayor frecuencia de los genes de resistencia específicos a razas en las especies silvestres de *Solanum* en México. El objetivo de esta investigación fue comparar la secuencia de tres genes nucleares: β -tubulina, *Ras* e Intron *Ras* y regiones ITS del DNA ribosomal de 25 genotipos de *P. infestans* con haplotipo mitocondrial Ia, aislados durante tres ciclos de cultivo en Chapingo, México, con las secuencias reportadas en el GenBank. Los resultados obtenidos demuestran que en México existen aislamientos del patógeno con una similitud del 100% con las secuencias reportadas para la región Andina, en las secuencias de los genes β -tubulina, *Ras* e Intron *Ras*; mientras que la región ITS no aportó ningún dato al respecto.

Palabras clave adicionales: genes nucleares, secuenciación, origen *P. infestans*, tizón tardío.

Sequence divergence analysis of the nuclear gene regions β -tubulin, Ras, Ras intron, ribosomal ITS and DNA regions in *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary from Chapingo, Mexico

ABSTRACT

There are two theories regarding the origin of *Phytophthora infestans*: 1) From the Andes, based on the observation and description of the pathogen back to the XVI century in South America, and recently, by molecular studies of the isolated populations from the Andes (Peru and Ecuador), which are associated to two lineages close to *Anarrhichomenum* (ancestor of *P. infestans*), while the isolates from Toluca, México, are derived from just one lineage from the Andean populations. 2) From central Mexico, supported by the presence of the A1 and A2 mating types of the pathogen in a 1:1 ratio, in addition to the detection of all the known enzymatic alleles, and the most frequency of the specific resistance genes to the wild *Solanum* species in Mexico as compared to the ones from the Andean region. In this study, three nuclear genes were sequenced (β -tubulin, Ras, and Ras intron, as well as the ITS regions of the ribosomal DNA) to 25 *P. infestans* genotypes with mitochondrial haplotype Ia, collected during three growth cycles in Chapingo, Mexico, and the resulting sequences were compared to the GenBank information. The results show that in Mexico there are isolates of the pathogen with a 100% similarity to the reported sequences for the Andean region for β -tubulin, Ras, and Ras intron, while the ITS region did not provide any data on this matter.

Additional key words: Nuclear genes, sequenciation, origin of *P. infestans*, late blight.

4.1 INTRODUCCION

Phytophthora infestans es el patógeno causante de la enfermedad conocida como tizón tardío en distintos cultivos de solanáceas. Es un organismo heterotálico con dos tipos de apareamiento, A1 y A2, se cree que ambos tipos proceden de Toluca, México. El tipo de apareamiento A2 se había confinado solamente a México hasta el año de 1980 y se consideraba que solo el tipo A1 era el causante del tizón en las demás regiones del mundo (Goodwin *et al.* 1994); sin embargo, a partir de 1981 se presentaron reportes de la presencia del tipo A2 en varios países de Europa, Oriente medio, Asia y Suramérica (Fry y Goodwin 1995). La presencia de los tipos de apareamientos en distintas regiones permitió que la población A1 haya sido desplazada por una nueva variante A1/A2, la cual ha resultado de la reproducción sexual de ambos tipos y se caracteriza por ser altamente virulenta y variable, características que le han permitido adaptarse a nuevos hospedantes y a diferentes condiciones medioambientales (Fry *et al.*, 1993; Fry y Goodwin, 1995).

Existen dos teorías acerca del origen del patógeno: Origen Andino basada en la observación y descripción del patógeno desde el siglo XVI en la región de Sudamérica posteriormente introducida a Europa (Abad, 1995). Recientemente Gómez-Alpizar *et al.*, (2007) señalaron mediante estudio molecular, que las poblaciones aisladas de los Andes (Perú, Ecuador) provienen de un linaje de *Anarrhichomenum* (una de las secciones en que se divide el género *Solanum*) y que las poblaciones estudiadas provenientes de EUA e Irlanda fueron derivados de los mismos linajes de las poblaciones de origen Andino; mientras que los aislamientos provenientes de Toluca México derivaron de un solo linaje de las poblaciones andinas. Hallazgos de ambos

tipos de apareamiento en Ecuador y la presencia de genotipos exóticos sobre hospedantes silvestres dan soporte a esta hipótesis (Adler *et al*, 2002).

Por otra parte, la Teoría de un Origen del Centro de México ha sido apoyada por varios grupos de trabajo, los cuales han presentado evidencias científicas como son el registro de la forma sexual del patógeno, reportada por Niederhauser en 1953, la presencia de las dos formas A1 y A2 en igual frecuencia, la detección de todos los alelos enzimáticos conocidos, los genes de resistencia específicos a razas son más frecuentes en el centro de México que en las regiones andinas (Tooley *et al*, 1989; Fry, 1993; Goodwin 1995; Andrivon, 1996) y el reporte del haplotipo Ib (Garay *et al.*, 2007).

El estudio de diversidad genética, la estructura poblacional, la migración y el origen de *Phytophthora infestans* ha sido abordado por diversos investigadores, siendo un común denominador el empleo de genes mitocondriales y nucleares (Gómez- Alpizar, *et al.*, 2003, 2007; Kroon *et al.*, 2004; Ávila *et al.*, 2005; Blair *et al.*, 2007; Cárdenas *et al.*, 2011). Dentro de los genes nucleares más utilizados para este propósito son los que codifican para las proteínas de la familia de la tubulina, por ser genes altamente conservados. Al tener un origen muy antiguo podría esperarse que sus secuencias presentaran una gran divergencia, sin embargo, esto sólo es cierto para el extremo C-terminal de las tubulinas α y β . Los fragmentos N-terminales están notablemente conservados con variaciones mínimas, este alto grado de conservación está seguramente impuesto por las limitaciones estructurales del ensamblaje y desensamblaje de microtúbulos (MTs), conjuntamente con las limitaciones impuestas por la asociación de proteínas como las kinesinas y dineínas. Los miembros individuales de la familia de las tubulinas de los distintos órdenes filogenéticos han evolucionado de una manera excepcionalmente lenta, a una tasa comparable de las

histonas o la actina. La alta tasa de conservación dentro de la familia de las tubulinas implica que las propiedades funcionales de estas proteínas imponen unas limitaciones enormes a cualquier diversificación de la secuencia, de manera que las mutaciones sólo pueden acomodarse en unas pocas posiciones sin producir un efecto deletéreo. Por lo tanto, cualquier modificación que se hubiera conservado, probablemente debería ser funcionalmente ventajosa y por ello debería estar seguramente relacionada con propiedades específicas de las tubulinas en órdenes diferentes (Chen y Roxby, 1996; Kroon *et al.*, 2004). Un segundo gen ampliamente utilizado es el que codifica para las proteínas Ras e intron Ras; estas proteínas son un conjunto de interruptores-reguladores moleculares muy importantes en una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares que controlan diferentes fenómenos: integridad del citoesqueleto; proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular y la apoptosis (Chen y Roxby, 1996). En esta investigación se emplearon tres genes nucleares: β -tubulina, Ras e intron Ras, así como la región ITS del DNA ribosomal con la finalidad de analizar la divergencia de las secuencias de los aislamientos de *Phytophthora infestans* de Chapingo con respecto a lo reportado en el GenBank para otros países.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 Aislamiento del patógeno

Se realizaron colectas de follaje de papa que presentaba lesiones de tizón en lotes experimentales del campo agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México, durante los ciclos de cultivo de 2008, 2009 y 2010. Los aislamientos de *P. infestans* fueron obtenidos a partir de folíolos y tallos con síntomas de tizón. En cajas Petri se colocaron los tejidos enfermos sobre rodajas de papa sana (var. Alpha) desinfestada con hipoclorito de sodio al 2 %, con el fin de inducir el crecimiento de micelio a temperatura ambiente. Al tercer día se observó el crecimiento de micelio al microscopio para confirmar la presencia del patógeno mediante preparaciones fijas. El micelio purificado se transfirió a medio sólido agar-centeno y se incubó a temperatura de 21 °C de acuerdo a la metodología propuesta por Grünwald *et al.* (2001).

4.2.2 Selección de muestras

De los aislamientos obtenidos se realizó la determinación del isoenzimas *Pep* y *Gpi*, además del tipo de compatibilidad para hacer una diferenciación de muestras y tomar aquellas que representaron a un genotipo diferente.

4.2.3 Extracción de DNA

Se llevó a cabo siguiendo el método de extracción propuesto por Griffith y Shaw (1998) en donde se utilizó el micelio crecido durante 10 días de cada aislamiento, se maceró con 800 µL de amortiguador de extracción (solución de NaCl 100 mM, Tris-HCl pH8 100mM, solución de NaCl 1.4 M, CTAB 2 % (p/v), EDTA 20 mM a pH 8), se incubó a 65 °C durante 1 h, se adicionaron 600 µL de cloroformo saturado con agua, la mezcla se agitó por inversión durante 15 s, se centrifugó a 15700 x g durante 12 min,

el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se adicionó RNAsa 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Posteriormente, se incubaron durante 1 h a 37 °C, se adicionaron 400 μL de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 20 min, se centrifugó a 15700 x g durante 12 min, se decantó el sobrenadante y se lavó el sedimento con 500 μL de etanol a 70 % (v/v), se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en solución amortiguadora TE (10 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 1 mM a pH 8) y se guardó a -20 °C.

4.2.4 Amplificación de genes nucleares

Con el DNA extraído se realizaron diluciones a 20 ng/ μL , posteriormente se realizaron las amplificaciones de los genes nucleares utilizados en este trabajo de investigación. Para la amplificación del fragmento del gen nuclear *Intron Ras* se utilizaron los iniciadores IRF 5'- TTGCAGCACAACCCAAGACG-3' y el iniciador IRR 5'- TGCACGACGTACTAT TCGGGG TTC-3'; para la amplificación del gen *Ras* se emplearon los iniciadores RASF 5'- CGTGTCTGCTTCTCCGTTTCG-3' y el iniciador reverse RASR 5'- CCAGGCTTTCGGCAAATTCC-3'; para el caso del gen de β -*Tubulina*, se emplearon los iniciadores TUB901 5'- TACGACATTTGCTTCCG-3' y TUB1401 5'- CGC TTGAACATCTCCTGG-3' (Integrated DNA Technologies USA). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: dNTP's 200 μM , MgCl_2 2.75 mM, 10 picomoles de cada iniciador, Albúmina de suero bovino (BSA) 160 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Amortiguador de PCR 1x, Go Taq DNA Polimerasa 1U (Promega), DNA 20 ng en un volumen final de 25 μL ; el programa de PCR fue un ciclo a 94 °C 1.5 min seguido de 35 ciclos de 94 °C 40 s, 55 °C 60 s, 72 °C 90 s con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos (Applied Biosystems 9700). Se visualizaron los amplicones en geles de

agarosa a 1.2 % (p/v), amortiguador de corrida Tris-HCl-ácido bórico- EDTA (TAE) a 90 V durante 90 min, teñidos con bromuro de etidio.

4.2.5 Amplificación región ITS

Para la amplificación de la región ITS1, 5.8S e ITS2 se utilizaron los iniciadores ITS 4 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' e ITS 5HP 5'- GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3'. que permitieron la obtención de un fragmento de 914 pb en Oomycetes (Cooke *et al.*, 2000). Las condiciones de amplificación fueron dNTP's 200 µM, MgCl₂ 2.75 mM, 10 picomoles de cada iniciador, Amortiguador de PCR 1x, Go Taq DNA Polimerasa 1U (Promega), DNA 80 ng en un volumen final de 25 µL; el programa de PCR fue un ciclo a 94 °C durante 5 min seguido de 35 ciclos de 94 °C 40 s, 55 °C 60 s, 72 °C 90 s con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos (Applied Biosystems 9700). Se visualizaron los amplicones en geles de agarosa a 1.2 % (p/v), amortiguador de corrida Tris-HCl-ácido bórico- EDTA (TAE) a 90 V durante 90 min, teñidos con bromuro de etidio.

4.2.6 Limpieza de los amplicones

Para realizar las reacciones de secuenciación se requirió la limpieza previa de los fragmentos amplificados mediante el empleo de la enzima SAP/EXO (Shrimp Alkaline Phosphatase y Exonuclease 1) para degradar los nucleótidos e iniciadores remanentes de la PCR. La reacción de limpieza se realizó bajo las siguientes condiciones SAP 1U (Promega), Exo I 10 U (Promega), agua desionizada 6.0 µL, producto de PCR 4.0 µL; la mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C y posteriormente 15 min a 72 °C. Se realizó la lectura de la concentración de DNA y se realizó una dilución 1:2 para lograr una concentración 0.2 µg ml⁻¹.

4.2.7 Secuenciación

Para la reacción de secuenciación se empleó el kit Terminator Ready Reaction V 3.1 (Applied Biosystems) con las siguientes especificaciones: RR mix 1x, templado 10 ng ml⁻¹, iniciador forward o reverse 3.2 pmol, amortiguador 1X en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de termociclaje fueron 35 ciclos de temperatura de desnaturalización 96 °C 10 s, alineamiento 50 °C durante 5 s y de extensión 60 °C durante 4 min. Posteriormente, se realizó la precipitación de los amplificados con etanol y se resuspendieron en formamida. Se empleó el Secuenciador 3130x Applied Biosystems.

4.2.8 Análisis de Secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de los distintos genes empleados se editaron empleando los programas Finch Tv 1.4.0, Mega 4.1. Posteriormente, se realizó una comparación con las secuencias reportadas en el GenBank mediante el programa BLAST, se realizó un alineamiento de todas las secuencias, para obtener como resultado una secuencia consenso. El agrupamiento de las secuencias de los genotipos se realizó mediante el programa MEGA 4 usando el coeficiente de similitud Neibor Joining.

RESULTADOS Y DISCUSION

4.3.1 Aislamiento del patógeno

Se obtuvieron 88 aislamientos en los tres años, los cuales presentaron características morfológicas distintivas de *P. infestans*: micelio cenocítico, hialino, presencia de esporangios ovoides a limoniformes, ahusados en la base con un pedicelo menor a 3 µm, semipapilados con paredes delgadas (Jaramillo, 2003; Pérez y Forbes, 2008; Jaimasit y Prakob, 2010).

4.3.2 Selección de muestras

De los 88 aislamientos presentados se identificaron al menos 24 genotipos diferentes (Cuadro 1) los cuales sirvieron como muestras para realizar la amplificación de genes nucleares y región ITS para la secuenciación.

Cuadro 1. Frecuencia de los genotipos de *Phytophthora infestans* identificados de acuerdo con el tipo de compatibilidad y aloenzimas *Pep* y *Gpi*.

Genotipo	TC	<i>Pep</i>	<i>Gpi</i>	Nº de aislamientos	Frecuencia
1	A1	100/100	86/111	3	0.034
2	A1	100/100	100/111/122	3	0.034
3	A1	100/100	86/122	1	0.011
4	A1	100/100	86/100/111	1	0.011
5	A1	100/100	86/100	2	0.024
6	A1	92/100	100/100	1	0.011
7	A2	100/100	86/122	2	0.024
8	A2	100/100	86/100	4	0.045
9	A2	100/100	100/122	2	0.024
10	A2	100/100	100/111/122	1	0.011
11	A2	100/122	86/100/122	1	0.011
12	A2	100/122	86/122	1	0.011
13	A1,A2	100/100	100/122	5	0.057
14	A1,A2	100/100	100/100	10	0.113
15	A1,A2	100/100	86/100/111	5	0.057
16	A1,A2	100/100	86/100/122	12	0.136
17	A1,A2	100/100	86/100	19	0.216
18	A1,A2	100/100	86/111	2	0.024
19	A1,A2	100/100	86/122	1	0.011

20	A1,A2	100/100	90/100	4	0.045
21	A1,A2	100/122	86/100/122	3	0.034
22	A1,A2	100/122	86/100	1	0.011
23	A1,A2	100/122	86/100/111	1	0.011
24	A1,A2	92/100	100/122	3	0.034

TC= tipo de apareamiento Pep= peptidasa Gpi= glucosa fosfato isomerasa.

4.3.3 Amplificación de genes nucleares

Los genes nucleares han sido ampliamente empleados en la determinación filogenética por ser genes conservados. Kroon *et al.*, (2004) utilizaron genes involucrados en el factor de elongación 1 α y el gen de β tubulina y establecieron que el género *Phytophthora* es monofilético; Gómez-Alpizar *et al.* (2007) lograron determinar el origen andino de *Phytophthora infestans* conforme a los genes nucleares β tubulina, *Ras* e *Intron Ras*, ya que los aislamientos de Sudamérica derivaron de dos linajes ancestrales divergentes de los tres reportados, que a su vez derivan del linaje de la sección *Anarrhichomenun*; por su parte Blair *et al.*, (2007) realizaron la historia evolutiva del género utilizando secuencias completas del genoma de *P. infestans*. Uno de los genes utilizados en este trabajo fue el gen *Ras*, los miembros de esta superfamilia de proteínas monoméricas GTP son específicos para el transporte y secreción de vesículas entre el retículo endoplásmico y el aparato de golgi. Dichas proteínas han demostrado que *P. infestans* está más relacionada o proviene de la misma línea evolutiva de las algas y plantas superiores que de los hongos verdaderos (Chen y Roxby, 1996).

El amplicón de *Ras* fue de 600 pb (Figura 1) y monomórfico para todas las muestras analizadas, este fragmento se utilizó para la respectiva secuenciación.

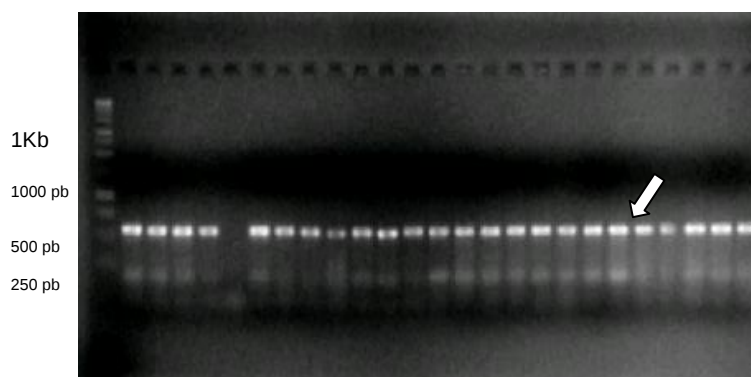


Figura 1. Gen Ras. Fragmento amplificado de 600 pb. Carriles 1 a 24 muestras M Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

El Intron Ras amplificó un fragmento monomórfico de 223 pb en todas las muestras analizadas, lo que corresponde al intron 1, adicionalmente se amplificó un fragmento de 600 pb correspondiente al intron 3 a 5 de la secuencia completa de Ras reportada en el GenBank GU258157, GU258165 (-67,-68) (Gómez-Alpizar *et al.*, 2003; Cárdenas *et al.*, 2011)

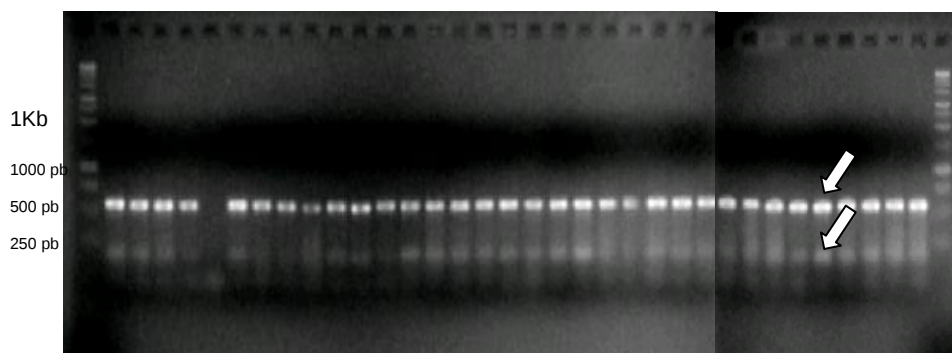


Figura 2 Gen Intron Ras (IRF) Fragmento amplificado de 223 pb y fragmento de 600 pb. Carriles 1 a 24 muestras M Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

El gen β -tubulina amplificó un fragmento de 542 pb, tal como lo reporta Gómez-Alpizar *et al.*, 2007, aunque existen otros autores que han amplificado un fragmento para este gen de 989 pb; pero como en estos casos se incluyen exones, se optó por la primera opción.

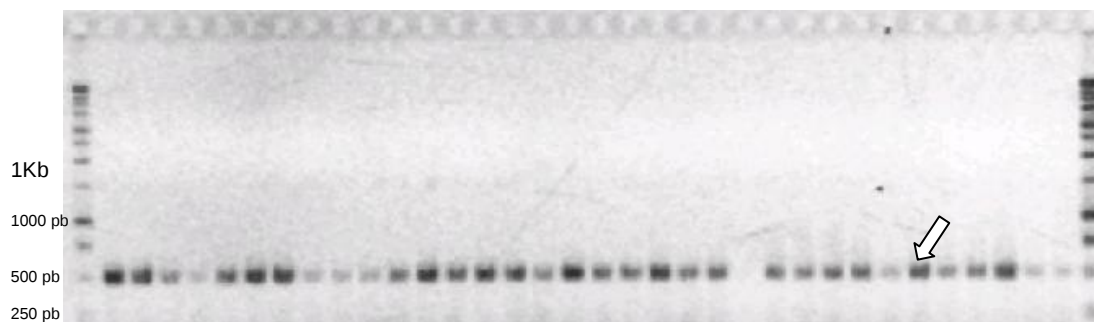


Figura 3 Gen β - tubulina. Fragmento amplificado de 542 pb. Carriles 1 a 24 muestras M Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

4.3.4 Amplificación región ITS

La región ITS ha sido empleada en distintos estudios para diferenciar a nivel de especies al género *Phytophthora*, ya que pueden hacerse inferencias evolutivas, generalmente el ITS 1 5.8 RNA ribosomal ha sido empleado para diferenciar género y el ITS 2 para separar especies (Lee y Taylor, 1992; Tooley *et al.*, 1997). El fragmento amplificado para *P. infestans* fue de 950 pb, característico de la especie como se muestra en la Figura 4.

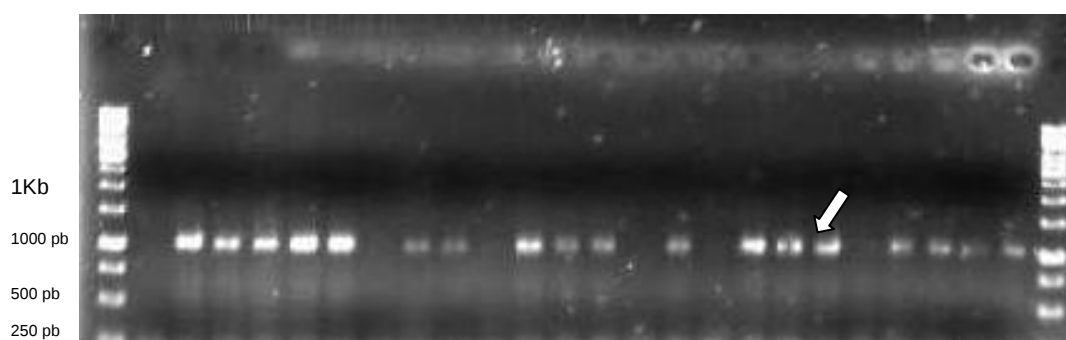


Figura 4 Región ITS 2. Fragmento amplificado de 950 pb. Carriles 1 a 24 muestras M Marcador de peso molecular de 1 kb (Promega).

4.3.5 Secuenciación y Análisis de Secuencias

Las secuencias derivadas del fragmento de 600 pb del gen Ras mostraron una lectura promedio de 545 bases, las cuales mediante su alineamiento y análisis mantuvieron una homología de 100 % con los aislamientos de Perú (número de accesoión en el GenBank EF367032.1, EF367103 a EF367106) reportados por Gómez-Alpizar *et al.*, (2007); así como con los aislamientos de la región norte Andina (Colombia, Venezuela y Ecuador) reportados por Cárdenas *et al.* (2011), cuyo número de accesoión es GU258154.1. En el mismo sentido, nuestras secuencias mantuvieron un 99% de homología respecto a la secuencia U30474.1 reportada por Chen y Roxby (1994) que utilizaron para ubicar a *P. infestans* en el grupo de algas. Esta secuencia corresponde a información involucrada en la formación de vesículas de transporte en el aparato de Golgi. Las secuencias de los genotipos empleados en este trabajo, para el gen Ras formaron dos grandes grupos; en donde los genotipos 2, 8,9 y 13 son iguales y se agruparon en uno solo, el resto de los aislamientos formaron otro grupo pero se observan diferencias o distancias entre ellos, lo que indica que tienen mayor número de polimorfismo en su secuencia (Figura 5).

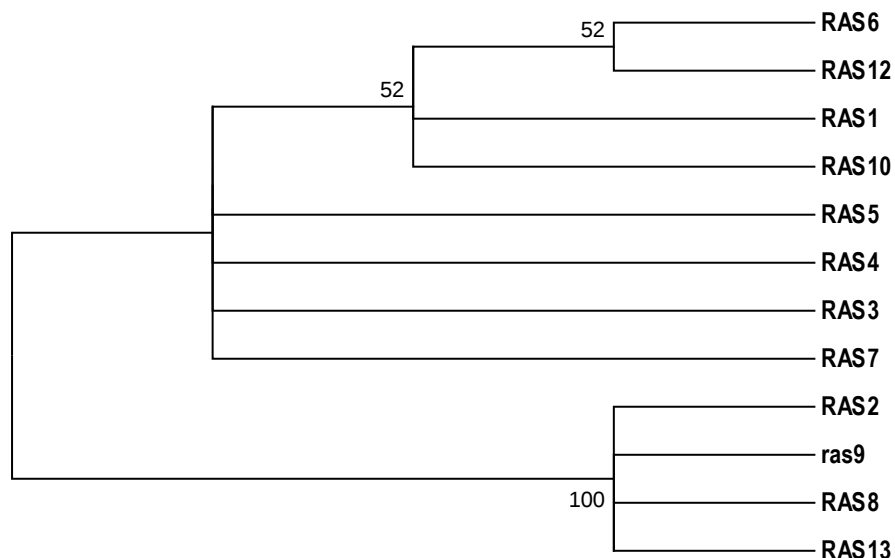


Figura 5. Dendrograma construido con el coeficiente de similitud Neibor Joining, utilizando las secuencias del gen Ras de los genotipos de *P. Infestans* de Chapingo, México.

Las secuencias derivadas del Intrón Ras tuvieron en promedio 220 bases, el análisis de secuencia presentó una homología del 100% con las reportadas (EF366950.1 y EF366795) por Gómez Alpizar *et al.* (2007) para aislamientos de Sur América y con lo reportado por Oliva *et al.*, (2010) en aislamientos de Ecuador (G0261022 a G0261027) usados para diferenciar especies de *Phytophthora* (*andina* e *infestans*). Las secuencias obtenidas en el presente estudio presentaron una homología del 99% respecto a los aislamientos de la región norte Andina reportados por Cárdenas *et al.* (2011). Nuestra información conformó 2 grupos, uno contuvo a la mayoría de los aislamientos formando un grupo homogéneo muy cercanos entre ellos, pero los genotipos 1 y 2 conformaron un grupo independiente (Figura 6). Por lo tanto las secuencias del intron Ras no presentaron variación alguna, únicamente los

genotipos 1 y 2 presentaron 6 puntos variables en la secuencia, por lo que se ubicaron en un agrupamiento distinto.

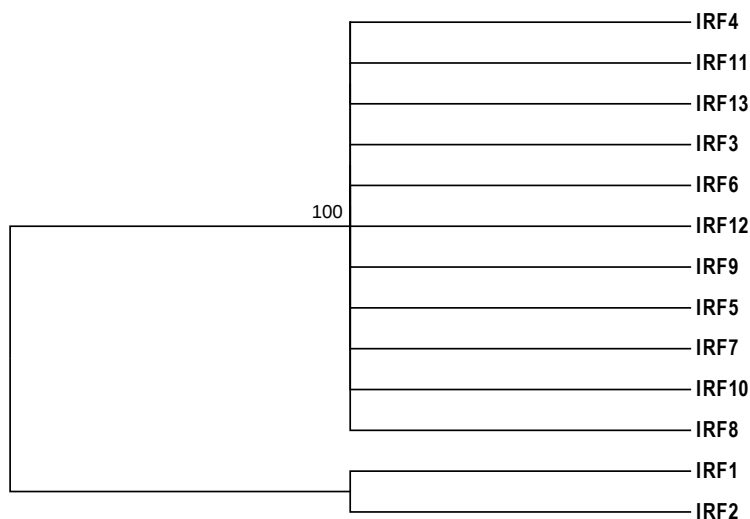


Figura 6. Dendrograma construido con el coeficiente de similitud Neibor Joining, utilizando las secuencias del *intron Ras* de los genotipos de *P. Infestans* de Chapingo, México.

El gen de la β - tubulina mostró una secuencia promedio de 500 bases con una similitud de 100 % con las secuencias reportadas por Cárdenas *et al.* (2011) con número de accesoión GenBank GU258162.1, GU258158.1 y GU258159.1 (2011) para los aislamientos de Colombia, Venezuela y Ecuador (Norte Andino). Así como una homología de 99 % para las secuencias EU079626.1 y EU079633.1 reportadas por Blair *et al.* (2007) las cuales permitieron demostrar la historia evolutiva del género *Phytophthora*. Se presentó el mismo porcentaje de homología de 99% con las secuencias reportadas por Kroon *et al.* (2004) con números de accesoión AY564036.1 y AY564037.1 que permitieron demostrar que el género es monofilético y se agrupa en clados en base a patogenicidad, morfología y reproducción. Por su parte al realizar el

análisis de las secuencias empleadas en este trabajo se obtuvo un agrupamiento en donde los genotipos 1, 2 y 3 presentan una homología de 100 %, es decir tienen las mismas secuencias formando un grupo, mientras que el resto de los genotipos se agruparon en otro grupo pero hay diferencias significativas entre ellas (Figura 7).

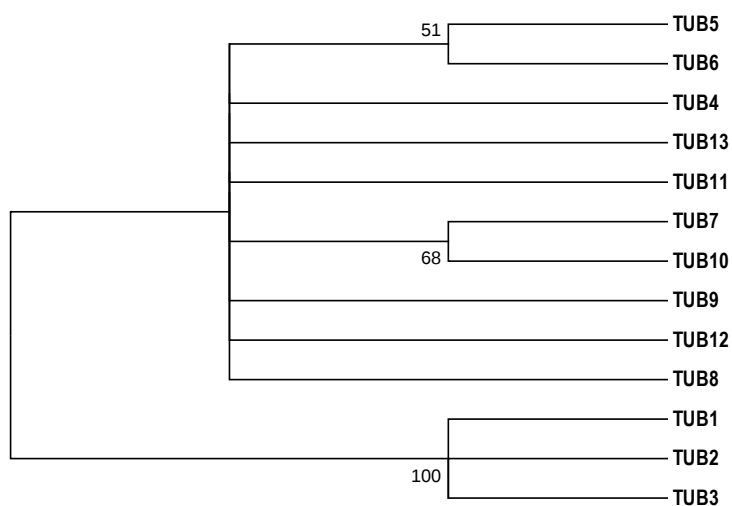


Figura 7. Dendrograma construido con el coeficiente de similitud Neibor Joining, utilizando las secuencias del gen β -tubulina de los genotipos de *P. Infestans* de Chapingo, México.

Por su parte las secuencias del ITS2 mostraron una homología de 100 % para las reportadas por Cárdenas *et al.* (2011) de aislamientos de origen Andino de la región de Colombia, Ecuador y Venezuela, con número de acceso al GenBank AY7700739.1, AF489701.1 y DQ479409.1. Al realizar el agrupamiento de las secuencias de ITS2 de los genotipos identificados en Chapingo, México se observó que todos presentan la misma secuencia, esto no permitió hacer una diferenciación de los genotipos solo se confirmó que pertenecen a la especie de *Phytophthora infestans*, por ello generalmente sólo se emplea para diferenciar especies dentro de un género en particular y no para diferencias al interior de la especie (Fig. 8).

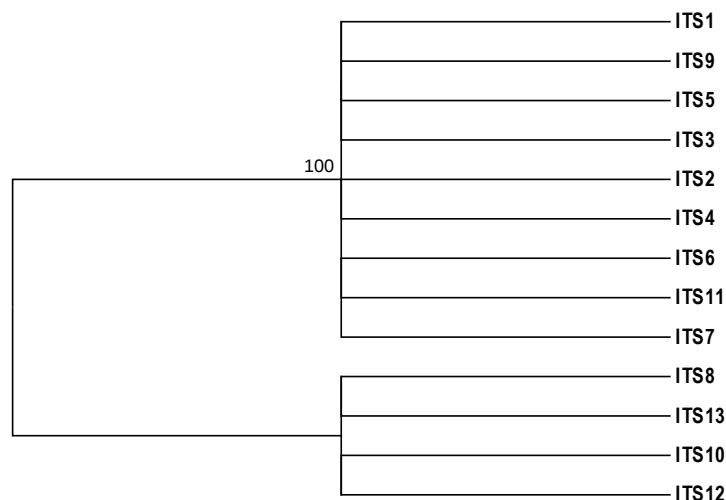


Figura 8. Dendrograma construido con el coeficiente Neibor Joining ytilizando utilizando las secuencias de ITS1 e ITS2 de los genotipos identificados en Chapingo, México.

En suma, las secuencias de las regiones ITS fueron idénticas para todos los aislamientos y presentaron altos niveles de identidad con aislamientos de otros hospedantes y regiones del mundo.

De manera general las secuencias de los aislamientos de Chapingo, México muestran una homología de 100 % con los aislamientos de origen Andino reportado por varios autores, esto puede conducir a dos planteamientos: el primero, que dichos genotipos se han encontrado siempre en México o segundo que provengan de Suramérica. Los resultados de este trabajo se suman a los distintos factores que sustentan la teoría del origen del patógeno en el centro de México; entre ellos cabe mencionar el estudio de las migraciones y distribución del patógeno a lo largo de la historia (Tooley *et al.*, 1989; Fry *et al.*, 1993; Andrivon, 1996; Goodwin, 1997; Hernández y Gómez, 2005); la gran diversidad genética reportada para el Valle de Toluca, México, en donde casi cada aislamiento es único (Godwin *et al* 1992), o uno

de cada 10 (Grunwald *et al.*, 2001). Otro factor es que se presentan todos los haplotipos mitocondriales ya que se dio el primer reporte del haplotipo Ib en Tlaxcala, México (Garay *et al.*, 2007), aunado a la alta diversidad genotípica reportada por distintos autores sustentan la teoría del origen en el centro de México.

Además cabe señalar que existen algunos factores que contradicen el origen Andino, entre ellos la ausencia de reproducción sexual del patógeno según se desprende de estudios de variabilidad y flujo de genes, la baja diversidad genética en Colombia y Venezuela, que no se presenten todos los genotipos en Suramérica (Cárdenas *et al.*, 2011). No obstante los hallazgos de ambos tipos de apareamiento sobre un mismo hospedante (*S. muricatum*) en Ecuador y la presencia de genotipos exóticos del oomycete sobre hospedantes silvestres como *S. ochrantum*, *S. hispidum* y *Brugmansia sanguínea*, han dado un nuevo auge a esta hipótesis siendo respaldados por los análisis moleculares de genes mitocondriales y nucleares que muestran un posible origen andino del patógeno sustentan también dicha teoría (Adler *et al.* 2002).

4.4 CONCLUSIONES

Los genotipos en Chapingo México presentan las mismas secuencias que los aislamientos reportados para la región andina. Los genes β -tubulina y Ras permiten la identificación de diferencias en las secuencias de los genotipos de *Phytophthora infestans*, mientras que el intron Ras y los ITS sólo confirman la homología del 100 % con los aislamientos del patógeno reportados en distintas partes del mundo sin mostrar diferenciación al interior de la especie.

4.5 RECOMENDACIONES

Para corroborar dicha sugerencia se recomienda hacer el análisis incluyendo a distintos genes mitocondriales de los genotipos identificados en Chapingo junto con todos los datos reportados hasta la fecha en el GenBank hasta la fecha.

4.5 LITERATURA CITADA

- Abad ZG, Abad JA, Ochoa C. 1995. Historical and scientific evidence that supports the modern theory of the Peruvian Andes as the centre of origin of *Phytophthora infestans*. En: Dowley LJ, Bannan E, Cooke RL, Keane T, Andosullivan E, editores. *Phytophthora infestans* 150. Dublin (Irlanda): Boole Press. pp. 239-246.
- Adler NE, Chacon G, Flier WG, Forbes GA. 2002. The Andean fruit crop pear melon (*Solanum muricatum*), is a common host for A1 and A2 strains of *Phytophthora infestans* in Ecuador. Plant Pathology, 51: 802.
- Andrison, D. 1996. "The origin of *Phytophthora infestans* Populations present in Europe in the 1840s: a critical Review of Historical and scientific Evidence2. Plant Pathology 45: 1027-1035.
- Avila, A. C., Gómez- Alpizar, L., Zismann, V., Jones, K.M., Buell, c. R. and J.B. Ristaino. 2005. Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-005-0016-3>
- Blair, J.E., Coffey, M.D., Park, S.Y., Geiser, D.M., and S. kang. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genet Biol 45:266-277.
- Cárdenas, M., Grajales, A., sierra, R., rojas, a., González-Almario, a., Vargas, A., Marin, M., Fermín, G., lagos, L.E., Grünwald, N. J., Bernal, A., Salazar, C., and S. Restrepo. 2011. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region. BMC Genetics 12:23.
- Chen Y, Roxby R, 1996. Characterization of a *Phytophthora infestans* gene involved in vesicle transport. Gene 181, 89–94.

- Cooke D, Drenth A, Duncan J, Wagels G, Brasier CM. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetic and Biology*, 30: 17-32.
- Fry EW, Goodwin SB. 1995. Recent migrations of *Phytophthora infestans*. En: Dowley LJ, Bannan E, Cooke RL, Keane T, Andosullivan E, editores. *Phytophthora infestans* 150. Dublin (Irlanda): Boole Press. pp. 89-95
- Fry EW, Goodwin SB, Dyer AT, Matuszak JM, Drenth A, Tooley PW, Sujkowski LS, Koh YJ, Cohen HA, Spielman JJ, Deahl KL, Inglis DA, Sandlan KP. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. *Plant Disease*, 77: 653-661.
- Garay, S. E., P. S. Fernández, A. G. Rodríguez , W. G. Flier, H. Lozoya S., R.I. Rojas, M., E. M. Goss and N. J. Grünwald 2007. First report of haplotipe I-b of *Phytophthora infestans* in Central Mexico. *Plant Disease* 91:909.
- Goodwin, B. s., Spielman, L.J., Matusak, J. M., Bergeron, S.N., and W.E. Fry. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. *Phytopathology* 82: 955-961.
- Goodwin SB, FryWE, 1994. Genetic analyses of interspecific hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora mirabilis*. *Experimental Mycology* 18, 20–32.
- Goodwin, S.B., L.S. Sujkowski and W.E. Fry. 1995. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of potato late blight disease fungus. *Phytopathology* 85: 669-676.
- Goodwin SB 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87: 462-473.

- Gomez- Alpizar L, Thorne JL, Ristaino JB. 2003. Molecular evolution of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 93:S30.
- Gómez-Alpizar L, Carbone I, Ristaino JB. 2007. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 9: 3306-3311.
- Griffith GW, Shaw DS. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 10: 4007-4014.
- Grünwald NJ, Flier WG, Sturbaum AK, Garay-Serrano E, van den Bosch TB, Smart CD, Matuszak JM, Lozoya-Saldana H, Turkensteen LJ, Fry WE. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. *Phytopathology* 91:882-890.
- Hernández G. K. y I G. Gómez 2005. Aplicación de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en el Estudio de Poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary causante del Tizón Tardío en papa y Tomate. *Fitosanidad* 9:39-50.
- 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.
- Jaramillo S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Medellín (Colombia): Universidad Nacional de Colombia.
- Kroon LPN, Bakker FT., Van Den Bosch GB, Bonants P, Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 766-782.

- Lee, S. B., T. J. White, and J. W. Taylor. 1993. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. *Phytopathology* 83:177–181.
- Oliva, R.F., Kroon, L.P.N. M., Chacón, G., Flier W.G., Ristaino, J.B., and G.A. Forbes. 2010. *Phytophthora andina* sp. nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the Andean highlands. *Plant Pathology* 59: 613–625
- Pérez W. y G. Forbes, 2008. Manual Técnico. El Tizón Tardío de la Papa. CIP. Lima, Perú. 39 p.
- Tooley, P.; Therrien, C. and Ritch, D.1989: Mating Type, race composition, nuclear DNA content and isozyme analysis of peruvian isolates of *P. infestans*. *Phytopathology* 79: 478-481.
- Tooley PW, Bunyard BA, Carras MM, Hatziloukas E. 1997. Development of PCR Primers from Internal Transcribed Spacer Region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1467-1475.

CAPITULO 5

V. DISCUSIÓN GENERAL

Con la presente investigación fue posible caracterizar la diversidad genética en los aislamientos de *Phytophthora infestans* en Chapingo, México durante tres ciclos de cultivo. Anteriormente Goodwin (1992) lo había hecho encontrando una diversidad genotípica de 0.92 destacando que fue el lugar dentro de la región central de México con el mayor índice de diversidad. Por su parte Grünwald *et al.* (2001) determinaron un índice Shannon- Wiener de 2.5 para la región central de México, sin embargo, nuestros resultados mediante marcadores bioquímicos muestran un índice de Shannon de 1.8 para Chapingo, esto puede deberse al carácter clonal de los aislamientos y a la presencia de muchos aislamientos homotáticos. También se obtuvieron 24 genotipos basados en perfiles isoenzimáticos (GPI y PEP) que en su mayoría ya están reportados para México (Grünwald *et al.*, 2001; Flier *et al.*, 2003; Lozoya *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2005), en su mayoría fueron únicos aunque el genotipo más frecuente fue el homotático (A1A2) con bandas 100/100 para *Pep* y bandas 86/100 para *Gpi*. En lo referente al tipo de apareamiento la mayoría fueron homotáticos, aquellos aislamientos heterotáticos presentaron una frecuencia 1:1 entre los tipos A1:A2. Mediante el empleo de 4 genes mitocondriales y la digestión de éstos por distintas enzimas de restricción, se determinó que el único haplotipo mitocondrial presente fue el Ia.

Debido a la relevancia del patógeno y a la necesidad de relacionar criterios de clasificación, uno de los objetivos fue establecer la relación existente con otras clasificaciones existentes para el patógeno. Los resultados mostraron que la alta frecuencia de homotalismo impidió el establecimiento de una relación de las

poblaciones estudiadas con clasificaciones establecidas ya que estas están basada en algún grupo de compatibilidad ya sea A1 o A2 pero no en genotipos homotáticos, lo que evidenció la necesidad de establecer criterios de clasificación del patógeno que puedan ubicar a distintos genotipos detectados en este trabajo y a los aislamientos homotáticos, ya que los sistemas actuales (US, EC, CA, etc.) no los incorporan.

El análisis de secuencias de las regiones ITS (1 y 2) no mostró ninguna variación entre los aislamientos, sólo permitieron conocer la homología de los aislamientos de México (Chapingo) con respecto a lo reportado en otros lugares del mundo por diversos autores. Las secuencias de los genes nucleares altamente conservados (β -tubulina, Ras e intron Ras) son importantes porque proporcionan información que puede ser complementaria para sustentar la teoría del origen mexicano del patógeno, ya que se encontraron que presentan una igualdad en 100 % con respecto a secuencias reportadas provenientes de aislamientos de origen Andino. Esta contribución se suma a los distintos aspectos que sustentan un origen mexicano del patógeno como son la alta diversidad genética, la presencia del haplotipo 1b (Garay *et al.*, 2007), la frecuencia 1:1 de los dos tipos de compatibilidad, produciendo una alta probabilidad de reproducción sexual.

Los resultados obtenidos permiten identificar las variantes que pueden presentarse en la población del patógeno, lo cual puede servir para diseñar estrategias de manejo y control en la región.

Lo anterior permite sugerir un estudio en el que se implique mayor número de genes nucleares y genes mitocondriales del patógeno, incluir secuencias de todos los aislamientos reportados en el GenBank y hacer una caracterización de todas las regiones donde se cultive papa y jitomate, así como incluir especies silvestres para

sustentar un análisis filogenético, además, es necesario incluir en las clasificaciones actuales a los aislamientos homotáticos, por lo que la clasificación puede basarse principalmente en secuencias de genes nucleares y mitocondriales.

5.1 LITERATURA CITADA

- Fernández P. S. P., A. G. Rodríguez, D. C. R. Belmar, A. K. Sturbaum, W. Flier y H. Lozoya S. 2005. Caracterización de Aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary provenientes de Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 23:191-197.
- Flier, W. G., N.J. Grünwald, L.P.N. Kroon, A. K. Sturbaum, T.B.M. van den Bosh, E. Garay, H. Lozoya, W.E. Fry, and L.J. Turkensteen, 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Touca Valley of Central Mexico suggests genetics differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. Phytopathology 93: 382-390.
- Garay, S. E., P. S. Fernández, A. G. Rodríguez, W. G. Flier, H. Lozoya S., R.I. Rojas, M., E. M. Goss and N. J. Grünwald 2007. First report of haplotipe I-b of *Phytophthora infestans* in Central Mexico. Plant Dis. 91:909.
- Goodwin, S. B., L. J. Spielman, J. M. Matuszak, S. N. Bergeron and W. E. Fry 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central México. Phytopathology 84:1224-1227.
- Grünwald NJ, WG Flier, AK Sturbaum, E Garay-Serrano, TB van den Bosch, CD Smart, JM Matuszak, H Lozoya-Saldana, LJ Turkensteen, WE Fry. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. Phytopathology 91:882-890.

Lozoya S. H., G. L. Guzmán, P. S. Fernández, N. J. Grünwald and E. McElhinny 2005.
Phytophthora infestans (Mont.) de Bary. I. Host –Pathogen specificity and resistance
components. Agrociencia 40: 205-217.