



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRIA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

VARIABILIDAD GENÉTICA Y ESPECIFICIDAD DE
Phytophthora infestans EN ESPECIES SILVESTRES DE PAPA.

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de Maestro En
Ciencias En Protección Vegetal

Presenta:

Alfredo López Salazar



Bajo la supervisión de: Héctor Lozoya Saldaña PH.D.

Chapingo, Estado de México, Mayo de 2022



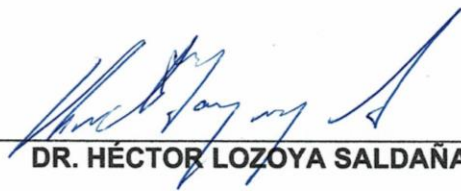
HOJA DE APROBACION DE TESIS

VARIABILIDAD GENÉTICA Y ESPECIFICIDAD DE *Phytophthora infestans* EN ESPECIES SILVESTRES DE PAPA.

Tesis realizada por **Alfredo López Salazar**, bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:


DR. HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR:


DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:


DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

DEDICATORIA

Con cariño a mis padres, María de los Ángeles Salazar Moreno y Crescencio López Cruz por el apoyo, cariño y motivación necesarios para cumplir cada objetivo que me he propuesto.

A mis hermanas, Norma, Irma, Maricela y Silvia, por sus consejos, respaldo, apoyo y cariño. Por ser un ejemplo para seguir y alentándome a siempre superarme.

A mis sobrinos, Victorino, Santiago, Jesús, Denisse, Fernanda y Valeria por ser la alegría de la familia, esperando contribuir y ser una fuente de inspiración y superación para ustedes.

A mis compañeros de generación, Uriel, Yulissa, Fernando, Susana, Silverio, Erida, Jovani, Helder, Iván y Samuel. Gracias por su amistad, apoyo y comprensión, esperando mantener este vínculo por el resto de nuestros días, por siempre H62.

A ti Miriam, por el apoyo, tiempo, respaldo y motivación brindado durante esta etapa, que, sin duda, fue determinante para culminar.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó para mis estudios de maestría y gastos de manutención.

A la Universidad Autónoma Chapingo por la oportunidad brindada para llevar a cabo mi especialización en materia de sanidad vegetal.

Al posgrado Maestría en Ciencias en Protección Vegetal y al Departamento de Parasitología Agrícola por ser los ejes centrales de esta especialización que, junto a sus invaluable profesores, contribuyeron a mi crecimiento como profesionalista.

A los miembros del comité asesor: Dr. Héctor Lozoya Saldaña por el apoyo, seguimiento y asesoría brindada durante el desarrollo de esta investigación, siendo determinantes sus consejos. Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por sus valiosas aportaciones en los estudios moleculares, así mismo, al Dr. Santos Gerardo Leyva Mir por el conocimiento brindado en la parte fitopatológica.

Al M.C. Antonio Segura Miranda, coordinador del posgrado en Protección Vegetal y a la Srita. Mari por las facilidades otorgadas, la disposición, apoyo y orientación en cuestiones administrativas.

Al personal de laboratorio de Micología del departamento de Parasitología Agrícola, Srita. Mariana y Sr. Juanito, por su enorme y constante apoyo para el desarrollo de esta investigación. A la Srita. Dolores, responsable del laboratorio de Biología molecular del departamento de Fitotecnia por su constante ayuda.

A mis compañeros de la generación 62 por estos años de amistad y apoyo mutuo.

La presente investigación tiene el objetivo de contribuir a los Programas Nacionales Estratégicos del Conacyt (PRONACES), en el área de Soberanía Alimentaria y la Conservación del Medio Ambiente.

DATOS BIOGRÁFICOS



Alfredo López Salazar, nacido en Texcoco, Estado de México el 10 de noviembre de 1991, desarrolló su bachillerato en la Preparatoria Agrícola perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo 2006-2009; encamino sus estudios profesionales en el departamento de Fitotecnia durante el periodo 2009-2014, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. Realizó sus estudios de posgrado durante 2020-2021 en el programa Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, perteneciente al departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Profesionalmente ha ejercido como extensionista en proyectos de desarrollo rural, ha prestado servicios como asesor-técnico y representante de ventas en agroinsumos trabajando en cultivos como maíz, frijol, papaya, jitomate, tomatillo, sandía, pepino, chiles y cítricos, además, ha tenido experiencia en el manejo de grupos y docencia.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DATOS BIOGRÁFICOS	v
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL. IMPORTANCIA DE <i>Solanum</i> Y SUS LIMITANTES DE PRODUCCIÓN.	xii
RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	5
PROBLEMA RESUELTO CON LA INVESTIGACIÓN	6
OBJETIVOS	7
GENERAL.....	7
ESPECIFICOS	7
HIPOTESIS	7
LITERATURA CONSULTADA	8
CAPITULO II. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary... 10	
REVISIÓN DE LITERATURA	11
Taxonomía (CABI, 2021):.....	11
<i>Phytophthora infestans</i> : Características y ciclo biológico	11
Epidemiología.....	12
Reproducción asexual	13
Reproducción sexual	14
Condiciones de desarrollo.....	14
Variabilidad genética de <i>P. infestans</i>	15
Caracterización molecular.....	16
Características de los marcadores ISSRs	18
LITERATURA CONSULTADA	22

CAPITULO III. VARIABILIDAD GENETICA DE <i>Phytophthora infestans</i> y ESPECIFICIDAD EN ESPECIES SILVESTRES DE PAPA.....	26
Variabilidad genética y especificidad de <i>Phytophthora infestans</i> en especies silvestres de papa. 1	
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	2
MATERIALES Y METODOS	3
ANALISIS MOLECULAR	3
PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD.....	5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
ANALISIS MOLECULAR	7
Evaluación de la eficiencia de los iniciadores.....	10
PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD.....	13
CONCLUSIONES	20
AGRADECIMIENTOS	21
LITERATURA CONSULTADA	22
ANEXOS Y PROTOCOLOS	26
ANEXO 1 OBTENCIÓN DEL INOCULO	1
Muestreo.....	1
Preparación de medio de cultivo selectivo	4
Centeno Agar.....	4
Avena Agar	5
Aislamiento de <i>Phytophthora</i>	7
Esporulación, inoculación y siembra en medio de cultivo	8
ANEXO 2. EXTRACCION DE ADN	13
Cuantificación de calidad de ADN	16
Preparación de diluciones	17
Preparación de mezcla de reacción Master mix (MaMi)	18
Iniciadores	19
PCR	20
Preparación de geles de agarosa	21
ANEXO 3. PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD	23
Siembra de materiales y obtención de follaje.....	23

Activación de los aislamientos	23
Recolecta del material vegetal	24
Inoculación	24
LITERATURA CONSULTADA	29

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de marcador basados en ADN.....	17
Cuadro 2. Lista de marcadores utilizados para realizar análisis QRT-PCR en tejidos de hojas y tubérculos.....	21
Cuadro 1. Valores promedio de severidad por especie, ciclos 2020 y 2021.....	6
Cuadro 2. ADN de <i>P. infestans</i> obtenido de distintas especies silvestres de papa.....	6
Cuadro 3. Evaluación de la capacidad de los marcadores usados.....	12
Cuadro 4. Especificidad demostrada en función de incidencia y severidad.....	13
Cuadro 5. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. albicans</i>	16
Cuadro 6. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. tuberosum</i>	16
Cuadro 7. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. acaule</i>	16
Cuadro 8. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. vernei</i>	16
Cuadro 9. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. microdontum</i>	16
Cuadro 10. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. juzepczuckii</i>	16
Cuadro 11. Materiales establecidos en el ciclo 2021.....	2
Cuadro 12. Preparación de medio Centeno Agar.....	4
Cuadro 13. Preparación de medio Avena Agar.....	5
Cuadro 14. Resultados estimados de cantidad y calidad de ADN de aislamientos de <i>P. infestans</i> provenientes de ocho especies silvestres de <i>Solanum</i>	16
Cuadro 15. Reactivos necesarios, volumen necesario, y concentración para preparación de MaMi.....	18
Cuadro 16. Lista de marcadores ISSRs usados.....	19
Cuadro 17. Número de propágulos/ml contados inicialmente por aislamiento.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>P. infestans</i>	14
Figura 1. Curva de desarrollo de <i>Phytophthora infestans</i> a través del tiempo en especies silvestres de <i>Solanum</i>	6
Figura 2. Huellas de ADN separadas en poliacrilamida de los productos de PCR de 6 aislamientos de <i>P. infestans</i> . 1(Mcd), 2 (Juz), 3 (Alb), 4(Tub), 5 (Acl) y 6 (Vrn).....	8
Figura 3. Distancias fenotípicas entre aislamientos de <i>P. infestans</i> desarrollado en distintas especies silvestres de <i>Solanum</i>	9
Figura 4. Curvas de desarrollo de aislamientos hechos de las especies silvestres: (A) <i>S. tuberosum</i> , (B) <i>S. acaule</i> , (C) <i>S. albicans</i> , (D) <i>S. vernei</i> , (E) <i>S. microdontum</i> y (F) <i>S. juzepczuckii</i>	14
Figura 5. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. albicans</i>	17
Figura 6. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. tuberosum</i>	17
Figura 7. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. acaule</i>	17
Figura 8. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. vernei</i>	17
Figura 9. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. microdontum</i>	17
Figura 10. Comparación de medias entre tratamientos, <i>S. juzepczuckii</i>	17
Figura 11. Materiales recolectados con daños característicos ocasionados por <i>P. infestans</i>	1
Figura 12. Lote del establecimiento de materiales genéticos ciclo 2021.....	2
Figura13. Siembra e identificación de las accesiones.....	3
Figura 14. Síntomas característicos para tomar muestras de cada especie.....	3
Figura 15. Preparación de medio de cultivo avena agar.....	6
Figura 16. Centrifugación de la solución para lograr un medio más puro.....	6
Figura 17. Obtención de una solución más pura, mezcla con componentes finales y su posterior esterilización.....	6
Figura 18. Contenedores usados para cámara húmeda.....	7
Figura 19. Desinfestación del tejido vegetal.....	8
Figura 20. Colocación del tejido dañado en cámara.....	9

Figura 21. Rodajas de papa colocadas por encima del tejido dañado con la finalidad de “filtrar” a <i>P. infestans</i>	9
Figura 22. Desarrollo de micelio después de más de 72 horas de haber sido colocada la rodaja de papa en tejido dañado.....	10
Figura 23. Transferencia de micelio a medio de cultivo.....	10
Figura 24. Desarrollo de micelio en medio de cultivo centeno.....	11
Figura 25. Desarrollo de <i>P. infestans</i> aislado de <i>S. demissum</i> y <i>S. acaule</i> en centeno agar.....	11
Figura 26. Uso de microscopio estereoscópico para la siembra de las puntas de hifa.....	12
Figura 27. Desarrollo de las hifas para la siembra, así como la presencia de clamidosporas.....	12
Figura 28. Desarrollo de aislamientos de <i>P. infestans</i> de distintas especies de <i>Solanum</i>	13
Figura 29. Transferencia de micelio a mortero, y su posterior maceración; preparación de reactivos para extracción.....	14
Figura 30. Obtención de muestras de ADN de <i>P. infestans</i>	15
Figura 31. Obtención de diluciones de cada muestra de DNA 20 ng/μL.....	17
Figura 32. Reactivos y preparación de la MASTER MIX por primer.....	20
Figura 33. Reacciones para introducir en el termociclador, y su posterior.....	21
Figura 34. Carga de las reacciones de PCR en el gel y encendido de la fuente de poder a 90 volts.....	22
Figura 35. Colocación del gel en el transluminador.....	22
Figura 36. Desarrollo de los aislamientos hechos de seis especies silvestres de <i>Solanum</i>	23
Figura 37. Foliolos de distintas especies de <i>Solanum</i>	24
Figura 38. Vista en el microscopio del hematocitómetro y su posterior conteo de propágulos.....	25
Figura 39. Preparación de cámaras húmedas.....	26
Figura 40. Inoculación de los foliolos con 1 gota de 20 μl.....	27
Figura 41. Evaluación de la severidad.....	28
Figura 42. Avance de la enfermedad y el desarrollo del micelio.....	28

**CAPITULO I. INTRODUCCIÒN GENERAL. IMPORTANCIA DE *Solanum* Y SUS
LIMITANTES DE PRODUCCIÒN.**

**CHAPTER I. GENERAL INTRODUCTION. IMPORTANCE OF *Solanum* AND ITS
PRODUCTION LIMITATIONS.**

RESUMEN GENERAL

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia alimenticia en el mundo, solamente superado por el arroz, trigo y maíz. Sin embargo, se ve amenazado por numerosas enfermedades, destacando el tizón tardío, causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, oomycete, organismo diploide heterotálico, que requiere los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) para reproducirse sexualmente; dicha característica le ha conferido un enorme potencial de variabilidad genética, lo cual genera la aparición de cepas más agresivas que rompen la resistencia generada por los hospederos. La mayoría de los genes de resistencia del género *Solanum* los han aportado *S. demissum*, *S. berthaultii*, y *S. bulbocastanum*.

El objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad existente entre los aislamientos obtenidos de seis especies silvestres de *Solanum* en el valle de Toluca, así como precisar su posible especificidad. Se obtuvieron aislamientos de *P. infestans* de seis especies de *Solanum*, seguida por la extracción del ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con 18 marcadores ISSRs de los cuales se obtuvieron bandas de calidad con 11 de ellos, integrando la información en una matriz binaria y desarrollado un árbol de similitudes. De los aislamientos de las seis especies de *Solanum*, cinco presentaron diferencias de acuerdo con los coeficientes de variación. La especificidad se determinó haciendo inoculaciones con seis aislamientos en 11 materiales silvestres, con resultados inconsistentes en incidencia y severidad, y en general, en el desarrollo de la enfermedad. Lo anterior demuestra la gran variación genética que presenta este oomycete, generando cepas más virulentas.

GENERAL ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food crops in the world, only surpassed by rice, wheat and corn. However, it is threatened by numerous diseases, notably late blight, caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, oomycete, heterothallic diploid organism, which requires the two types of compatibility (A1 and A2) to reproduce sexually; This characteristic has conferred an enormous potential for genetic variability, which generates the appearance of more aggressive strains that break the resistance generated by the hosts. Most of the resistance genes of the genus *Solanum* have been provided by *S. demissum*, *S. berthaultii*, and *S. bulbocastanum*.

The objective of this work was to determine the variability between the isolates obtained from six wild species of *Solanum* in the Toluca valley, as well as to specify their possible specificity. *P. infestans* isolates were obtained from six *Solanum* species, followed by DNA extraction. The polymerase chain reaction (PCR) was performed with 18 ISSRs markers of which quality bands were obtained with 11 of them, integrating the information into a binary matrix and developed a similarity tree. Of the isolates of the six *Solanum* species, five showed differences according to the coefficients of variation. Specificity was determined by inoculations with six isolates in 11 wild materials, with inconsistent results in incidence and severity, and in general, in the development of the disease. The above demonstrates the great genetic variation that presents this oomycete, generating more virulent strains.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia alimenticia en el mundo expresado en términos de consumo humano, solamente superado por arroz, trigo y maíz. Es considerada esencial y como base para la seguridad alimentaria frente el enorme crecimiento demográfico y aumento de las necesidades alimenticias (CIP, 2021).

Dada la enorme importancia que conlleva la producción de este cultivo, se ve amenazado por numerosas enfermedades de tipo fungosas, destacando el tizón tardío (TT), enfermedad que puede llegar a causar pérdidas de hasta el 100 % si no se tiene un adecuado manejo (Du *et al.*, 2015).

El TT es causado por el organismo *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary perteneciente al reino Stramenopila (Chromista), Clase: Oomycetes. Se caracteriza por ser un organismo diploide heterotálico, es decir, es un organismo que requiere los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) para reproducirse sexualmente. Antes de la década de 1980, el tipo de compatibilidad A1 era el que predominaba de manera común a nivel mundial; posteriormente el tipo A2 fue reportado en Europa, que estuvo únicamente limitado en México desde la década de 1950 posterior a su identificación (Alarcón *et al.*, 2013). Al estar presentes los dos tipos de compatibilidad, las probabilidades de recombinaciones genética se incrementan considerablemente, generando cepas más agresivas, lo que es un problema determinante para el proceso de producción del cultivo de papa (Whisson *et al.*, 2016).

P. infestans, así como otras especies relacionadas entre sí pertenecientes al clado 1C de *Phytophthora*, tienen origen en el centro de México. La diversidad de poblaciones en el centro de México es la fuente de un gran número de cepas más virulentas (Goss *et al.*, 2014; Shakya *et al.*, 2018).

La estructura genética de una población es capaz de revelar el poder evolutivo que puede llegar a tener, y en este caso, la capacidad de generar una enfermedad como proceso de adaptación. Las poblaciones de *P. infestans* muestran una mayor

probabilidad de evolución debido a que presentan altas tasas de mutación, son poblaciones muy grandes, tienen alto flujo de genes, un sistema de reproducción mixto y una selección eficiente (Guo, 2008). El uso de ISSR (Secuencias intergénicas repetitivas simples) es una de las técnicas más factibles para estudiar a las poblaciones de *P. infestans* a diferencia de otros marcadores; los marcadores utilizados son de uso universal, y no es necesario conocer la secuencia genómica completa o específica del organismo de estudio. Para *P. infestans*, el uso de ISSR ha permitido separar grupos de ciertos aislados en función de su hospedante, y con ello generar grupos de acuerdo con similitudes moleculares (Jarrin, 2006).

La formación de grupos de variantes en función de ciertos marcadores (ISSR), facilita la amplificación de genes de avirulencia del patógeno (*Avr*), que pueden ser percibidos por el hospedante cuando se combinan con los genes R de resistencia de la planta (Guo, 2008). Hasta la fecha se conocen 10 genes *Avr* de *P. infestans* (*Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr4*, *Avrblb1*, *Avrblb2*, *Avrvnt1*, *AvrSmira1*, y *AvrSmira2*; Yin *et al.*, 2017), que codifican ciertas proteínas y tienen el objetivo de evadir mecanismos de defensa del hospedante (Izarra y Lindqvist, 2016).

El uso de marcadores moleculares para el estudio de poblaciones se ha vuelto una herramienta muy valiosa en los últimos años. Los marcadores de ISSR son en si una secuencia de información más corta que la información que define a un microsatélite, lo cual permite la amplificación de secuencias que se encuentran entre dos microsatélites del mismo tipo; es decir, con la misma información nucleotídica. Para *P. infestans*, el uso de iniciadores o primers para marcadores tipo ISSR con PCR, ha permitido separar grupos de ciertos aislados en función de su hospedero. Los productos obtenidos de la PCR (marcadores) se revelan en geles de acrilamida o agarosa (Jarrin, 2006). Mediante programas como Freetree o NTSYS, pueden realizarse dendogramas que facilitan observar las características genéticas de los taxones, determinando las similitudes entre los individuos analizados.

El conocimiento de la variabilidad genética de *P. infestans* es de suma importancia para los programas de manejo integral de plagas (MIP), siendo el control genético una de las alternativas. *S. demissum* ha aportado en su mayoría, los genes de

resistencia para el control genético de *P. infestans*, así como también *S. berthaultii* y *S. bulbocastanum*; sin embargo, esta resistencia generada es específica para algunas razas, conocida como resistencia de tipo vertical. Por lo cual es importante determinar si existen otras especies que presenten algún tipo de resistencia a las distintas variantes de *P. infestans* endémicas de la mayor fuente de variabilidad genética de este patógeno, el valle de Toluca, México (Pérez, 2008).

JUSTIFICACIÓN

El Tizón tardío es el principal factor limitante en cuanto a la producción de papa, causando pérdidas totales si no se implementan estrategias basadas en un control integral. El agente causal es *P. infestans*, cuya variabilidad genética, derivada de los grupos de compatibilidad A1 y A2 es enorme, generando una constante evolución y, por ende, la aparición de cepas más virulentas. El manejo genético ha cobrado importancia en los últimos años como parte de un manejo integral, el conocimiento sobre la interacción entre genes R (Hospedante) y genes Avr (Patógeno) parece tener parte de la respuesta hacia la generación de materiales con resistencia a esta enfermedad. Actualmente la mayoría de los genes R provienen de *Solanum demissum*, aunque esta resistencia es específica para ciertas razas y no es muy estable. La caracterización mediante el uso de técnicas moleculares para este patógeno se ha convertido en una herramienta de gran utilidad que permite determinar su variabilidad, y al mismo tiempo conocer la susceptibilidad que presentan algunas silvestres de *Solanum*.

El presente trabajo, tiene como objetivo determinar la variabilidad genética de *P. infestans* en ocho especies de papa silvestre en el valle de México, haciendo uso de marcadores ISSR, ideales para caracterización de poblaciones, desarrollando un dendograma de similitudes entre aislamientos y determinar si existe correlación entre la especificidad patógeno/hospedante y la variabilidad del oomycete. El uso de ISSR presenta enormes ventajas, pues son marcadores universales, no es necesario conocer la secuencia genética completa del individuo y se requiere muy poca cantidad de ADN para el análisis. El conocimiento de esta información

conducirá al establecimiento de pruebas de especificidad entre variantes del patógeno y los hospedantes, con la finalidad de conocer su respuesta inmunológica y la detección de nuevos posibles genes de resistencia, aportando información para posibles trabajos de mejoramiento genético en papa.

PROBLEMA RESUELTO CON LA INVESTIGACIÓN

- El conocimiento sobre la variabilidad genética de *P. infestans* permitirá establecer una relación directa con la virulencia y severidad en el cultivo de papa, y con ello ayudar a complementar el manejo genético de la enfermedad.
- La determinación de la especificidad es de suma importancia, dado que, cualquier variante de *P. infestans* que sea agresiva o, por otro lado, poco virulenta a determinada especie de *Solanum* en el valle de México, puede que lo sea en todo el mundo, aportando información para el desarrollo y mejoramiento genético para resistencia a esta enfermedad.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la variabilidad genética de distintos aislamientos de *P. infestans* provenientes de especies silvestres de papa, precisando la especificidad existente entre las mismas.

ESPECIFICOS

- a) Determinar la similitud entre las variantes aisladas de *P. infestans* mediante marcadores genético-moleculares ISSRs.
- b) Evaluar la especificidad entre las variantes de *P. infestans* y cada una de las especies de papa.

HIPOTESIS

- Al menos una variante aislada de *P. infestans* será diferente a las demás.
- Al menos una especie silvestre de papa será tolerante a todos los agrupamientos de *P. infestans* identificados.

LITERATURA CONSULTADA

- Alarcón-Rodríguez, N. M., Lozoya-Saldaña, H., Valadez-Moctezuma, E., García-Mateos, M., & Colinas-León, M. T. (2013). Genetic diversity of potato late blight [*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary] at Chapingo, Mexico. *Agrociencia*, 47(6), 593-607. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v47n6/v47n6a6.pdf>
- CIP (2021). International Potato Center - Papa. Consultado en: <https://cipotato.org/es/potato/>, Fecha de consulta: 23/02/2021.
- Du, J., Verzaux, E., Chaparro-Garcia, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L. P., Zhou, J., ... & Van Der Vossen, E. A. (2015). Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature plants*, 1(4), 1-5. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.34>
- Goss, E. M., Tabima, J. F., Cooke, D. E., Restrepo, S., Fry, W. E., Forbes, G. A., ... & Grünwald, N. J. (2014). The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(24), 8791-8796. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401884111>
- Guo, J. (2008). *Phytophthora infestans* avirulence genes: mapping, cloning and diversity in field isolates. Wageningen University and Research. 138 pp.
- Izarra, M., & Lindqvist-Kreuzer, H. (2016). Expression of RXLR effectors in the EC-1 clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Peru. *Revista Peruana de Biología*, 23(3), 293-299 <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v23i3.12864>
- Jarrín, F. (2006). Herramientas moleculares aplicadas a la investigación de *Phytophthora infestans* en la estación de CIP de Quito. Departamento

de Patología. Centro Internacional de la Papa. Estación Quito, Ecuador.
<http://cipotato.org/wp-content/uploads/congreso%20ecuatoriano%202/FJARRIN.doc>

Perez, W. (2008). *Manual técnico. El Tizón tardío de la papa*. International Potato Center Vol 1. ISBN 978-92-9060-343-6. Pp. 41. Consultado en https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=aHA57_Yv4-MC&oi=fnd&pg=PA7&dq=manual+tecnico+del+tizon+&ots=aTr5f1cJ3d&sig=h2Z9X2dydrm_S4BKt7ajplx-6s#v=onepage&q=manual%20tecnico%20del%20tizon&f=false

Shakya, S. K., Larsen, M. M., Cuenca-Condoy, M. M., Lozoya-Saldaña, H., & Grünwald, N. J. (2018). Variation in genetic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Mexico from the center of origin outwards. *Plant disease*, 102(8), 1534-1540. doi: 10.1094/PDIS-11-17-1801-RE.

Whisson, S. C., Boevink, P. C., Wang, S., & Birch, P. R. (2016). The cell biology of late blight disease. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 127-135. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.09.002>

**CAPITULO II. DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *Phytophthora*
infestans (Mont.) de Bary.**

**CHAPTER II. DESCRIPTION AND CHARACTERIZATION OF *Phytophthora*
infestans (Mont.) de Bary.**

REVISIÓN DE LITERATURA

El tizón tardío del cultivo de papa es causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, es una de las enfermedades más devastadoras de la papa a nivel mundial.

Taxonomía (CABI, 2021):

Reino: Stramenophyla o Chromista

Phylum: Oomycota

Clase: Oomycetes

Orden: Pythiales

Familia: Pythiaceae

Género: *Phytophthora*

Especie: *P. infestans*

Phytophthora infestans: Características y ciclo biológico

P. infestans puede reproducirse de forma sexual y asexual. La reproducción sexual solo puede darse cuando se encuentran presentes los dos tipos de apareamiento (A1 y A2), la cual estaba dada exclusivamente en la zona centro de México. La reproducción asexual se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo, y la principal fuente de infección son los tubérculos utilizados como semilla, así como también en los residuos vegetales (Zwankhuizen *et al.*, 1998).

El micelio desarrollado por *Phytophthora infestans* no presenta divisiones celulares (septas). Se caracteriza por tener esporangios de forma oval, en algunos casos elipsoidales o de forma alimonada. Los esporangióforos tienen un ligero hinchamiento justo debajo del esporangio. *P. infestans*, cuenta con dos tipos de apareamiento (A1, Y A2), pero más que diferencia sexual, se refiere a la producción y respuesta hormonal en cada grupo de compatibilidad. Se ha propuesto que la producción hormonal en cada uno de los grupos de compatibilidad estimula al grupo contrario de apareamiento para llegar a formar estructuras de reproducción como las oosporas. Los aislamientos de *P. infestans* son de tipo bisexual y autoincompatibles, por lo que se han caracterizado y existen reportes de una escala medible de la “feminidad” o “masculinidad” que poseen. Así de esta forma, aquellos

que presentan mayor “masculinidad”, tienden a formar en su mayoría anteridios, mientras que los que presentan mayor “feminidad”, tienden a formar más oogonios que anteridios; de igual forma, existen aislamientos que presentan un equilibrio entre los parámetros antes mencionados (Pérez, 2008).

Para que sea posible la reproducción sexual, es necesario tener presentes los dos tipos de apareamiento que se fusionan entre sí, y se obtiene como resultado la formación de oosporas, cuya principal función es servir como estructuras de supervivencia dado a sus paredes gruesas. Se ha determinado la formación de oosporas en especies heterotalicas de *P. infestans* como respuesta a la estimulación producida por la aplicación de algunas moléculas químicas como el cloroneb, metalaxyl y el etazol, y también a la aplicación de algunos organismos antagonistas como *Trichodermas* como posible mecanismo de defensa (Groves & Ristaino, 2000).

Epidemiología

La enfermedad también se desarrolla en el período post-cosecha, a partir de tubérculos infectados, o durante el período vegetativo por lavado de esporangios hacia el suelo y en contacto con partes aéreas de plantas infectadas. Durante su almacenamiento, estos tubérculos enfermos pueden formar brotes que se convierten en fuentes primarias de infección de tubérculos sanos o de un nuevo cultivo si se utilizan como material de propagación vegetativa. Tras la infección inicial, las condiciones climáticas son determinantes para el desarrollo y progreso de la enfermedad. Bajo condiciones favorables y en variedades susceptibles, aproximadamente tres días después de la infección, aparecen los primeros síntomas en las hojas y tallos en forma de pequeñas manchas que luego se van extendiendo. Además, el desarrollo se ve favorecido por la humedad relativa mayor del 95%, así como la aparición de lluvia, rocío o riego elevado (Alor, 2015).

Con base a estas condiciones, existen sistemas de pronóstico meteorológico que alertan del riesgo de extensión de la enfermedad. Se conoce como período Smith el intervalo de tiempo de al menos dos días consecutivos en los cuales la

temperatura mínima es superior o igual a 10 °C, y cada día, durante al menos 11 h, la humedad relativa es superior al 90% (Cooke *et al.*, 2011).

El tizón se desarrolla y se propaga de forma más eficiente a bajas temperaturas y humedades relativas altas. Con esas condiciones ambientales, en menos de cuatro días puede completarse un ciclo causando importantes daños en los tejidos de las plantas. Dicho lo anterior, las lesiones en las hojas con producción de micelio son más evidente después de una noche con humedad relativa alta o después de una lluvia. Los esporangióforos con los esporangios pueden ser visibles al borde de las lesiones de forma de micelio blanco, principalmente en el envés de la hoja. Los esporangios que se desarrollan en las hojas pueden ser desprendidos por el golpe de las gotas de lluvia y dispersados hacia el suelo. Otra manera de generar infección ocurre cuando se realiza la cosecha en días lluviosos. Los esporangios que se encuentran en el ambiente infectan a los tubérculos, desarrollándose la enfermedad cuando ya están almacenados (Alor, 2015).

Reproducción asexual

En condiciones de alta humedad y bajas temperaturas, los esporangios después de germinar producen en promedio 10 zoosporas biflageladas y uninucleadas, estas se forman dentro del esporangio y son liberadas a nivel de la papila para nadar libremente. Poseen dos flagelos, uno de ellos de mayor longitud el cual le permite desplazarse por los cuerpos de agua. Al encontrar una superficie sólida se enquistan, si las condiciones de humedad lo permiten, puede desarrollar un tubo germinativo y penetrar por estomas de las hojas, o puede formar un apresorio donde la hifa penetra directamente sobre la cutícula. Una vez realizada la penetración, el micelio se sigue desarrollando hasta formar haustorios (Pérez, 2008).

Reproducción sexual

P. infestans es un oomiceto heterotálico por lo que los gametangios se formarán en dos hifas diferentes, para lo cual deberán estar presentes los dos tipos de apareamiento (A1 y A2). Para que se desarrolle el proceso de fertilización y la formación de una oospora es necesario la unión entre el oogonio y el anteridio. Una vez producida la oospora, puede sobrevivir en residuos de cosecha dadas sus gruesas paredes celulares. Cuando se presentan las condiciones ideales, la oospora desarrolla un tubo germinativo (esporangio) que puede liberar zoosporas y formar un nuevo tubo germinativo, quienes serán la principal fuente de inóculo (Pérez, 2008).

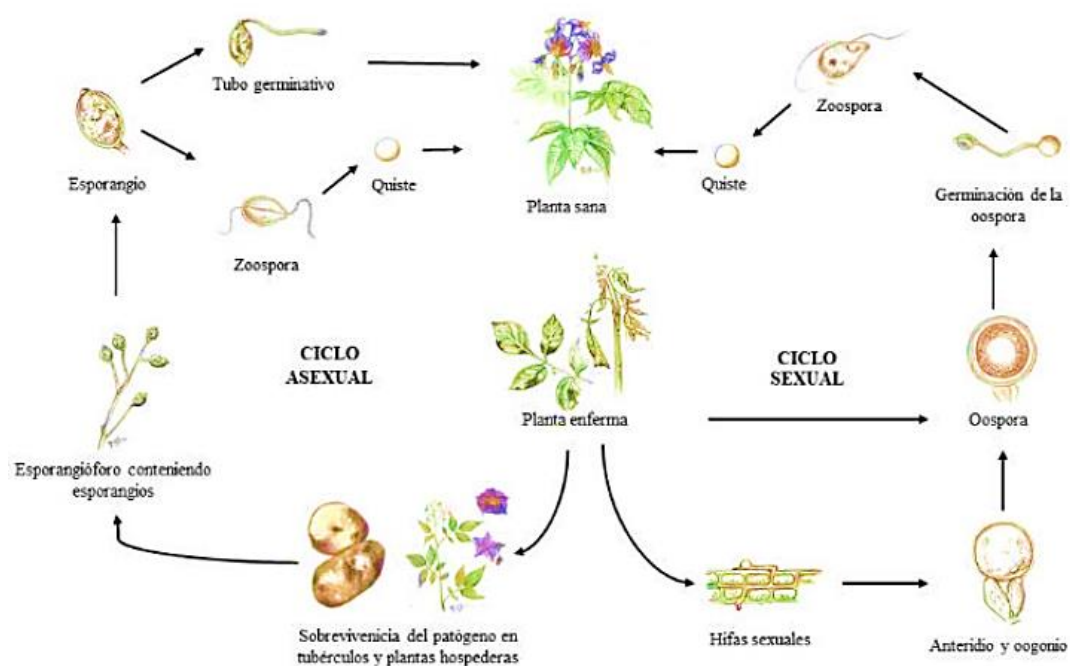


Figura 1. Ciclo biológico de *P. infestans*. (Enciso et al., 2021)

Condiciones de desarrollo

El desarrollo y epidemiología de *P. infestans* está fuertemente determinado por las condiciones climáticas, específicamente en regiones con clima templado. La mayor parte de la investigación realizada sobre Tizón tardío en el cultivo de papa en México

ha sido en el valle de Toluca, ya que presenta características específicas que lo hacen único para el desarrollo de dicho patógeno. En comparación con los típicos climas templados, el valle de Toluca se caracteriza por tener veranos con temperaturas “frescas” y precipitaciones casi de forma constante. El periodo de lluvias se presenta de los meses de julio a septiembre, con temperaturas medias de los cinco a diez °C y máximos de 20°C todos los días; la humedad juega un papel fundamental, dado que el 80 % de los días en este periodo de meses presentan una humedad relativa superior al 90% entre 12 y 16 horas al día, generando así las condiciones ideales para el desarrollo del patógeno, y con ello, haciendo privilegiada a esta zona del valle de Toluca (Grünwald *et al.*, 2005).

La diversidad genética de la progenie de *P. infestans* ha obligado a los investigadores en generar resistencia no específica, es decir, haciendo uso de genes menores o de resistencia horizontal, ya que, inicialmente los trabajos de investigación estaban enfocados a la resistencia específica, cuyos resultados en un inicio fueron buenos, sin embargo, al paso el tiempo, las variedades de papa comenzaron a ser susceptibles al ataque de *P. infestans*, derivado de las diversas variantes o razas del patógeno (Barquero *et al.*, 2005).

Variabilidad genética de *P. infestans*

P. infestans ha mostrado de manera constante una enorme diversidad genética en la zona centro de México, debido al tipo de reproducción sexual y grupos de compatibilidad presentes. Se ha reportado que todas las razas de este patógeno están presentes en el valle de Toluca, aunque dada su enorme amplitud de variabilidad genética impide que se alcance una frecuencia persistente de un ciclo a otro. Cuando se analiza exclusivamente en términos de raza fisiológica, cada aislamiento obtenido podría ser en sí, una raza; pero al contemplar al genotipo completo, esta frecuencia se reduce aún más. Con lo anterior, la presencia de razas es continua y similar de un ciclo a otro, pero los genotipos presentaron un alto número de variantes (Belmar & Lozoya, 2013).

Se realizó un estudio de la estructura poblacional de *P. infestans* en seis regiones en México, cercanas a la que se considera el centro de origen de este patógeno, la cual sugiere que existe una alta diversidad genotípica más allá de la que se presentan en el valle de Toluca, considerando que existe un flujo genético y reproducción sexual desde el centro del país hacia las demás regiones. Durante la genotipación de los aislados, se consideró que la reproducción sexual de *P. infestans* era diploide, pero hubo algunos aislados trisómicos e incluso tetrasómicos, con lo cual puede corroborarse la enorme variabilidad genética que presenta este patógeno (Shakya *et al.* 2018).

Caracterización molecular

Las principales fuentes de variación genética en *P. infestans* son la reproducción sexual, que en su mayoría es el mecanismo que mayor variación aporta, pero también la mutación, la recombinación mitótica, la migración y la selección, en menor proporción, respectivamente. Existen diversos marcadores para caracterizar a las poblaciones de *P. infestans*, destacando la virulencia, isoenzimas, tipos de apareamiento, haplotipos mitocondriales, RFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción) y SSR (Microsatélites). Estos últimos (RFLP y SSR) son marcadores genético-moleculares utilizados para el estudio de la información genética que permiten identificar razas o linajes, entre otros. Es necesario que los fragmentos de DNA sean amplificados y analizados por técnicas específicas como electroforesis y PCR, y dependiendo del tipo de marcador, su posterior secuenciación, y así iniciar con los procesos de caracterización e identificación (Pérez, 2008).

El uso de marcadores se ha convertido en el principal medio para la identificación de especies de organismos fitopatógenos, así como también la determinación de la variabilidad genética en las poblaciones estudiadas. El uso de ISSR (Secuencias intergénicas repetitivas simples) parece ser la más sencilla, confiable y fácil de usar, incluso podría proporcionar un alto polimorfismo genómico en comparación con los SSR y RAPD (Li *et al.*, 2012). En el cuadro 1, Arafa & Shirasawa (2018), describen a los ISSR con ciertas características que facilitan su uso en comparación con otros

marcadores, presentan alta dominancia, así como también buena precisión y alta velocidad de alineamiento. Para la caracterización de organismos mediante el uso de ISSR, no es necesario tener una gran cantidad de ADN, y al ser marcadores universales, no se requiere conocer la secuencia del organismo a utilizar, cualidades que facilitan su uso.

Cuadro 1. Algunas características de marcadores basados en ADN. (Arafa y Shirasawa, 2018).

Marcador	Dominancia	Reproducibilidad	Precision	Velocidad
RFLP	Co-dominante	Alta	Media	Baja
RAPD	Dominante	Baja	Baja	Alta
AFLP	Dominante	Alta	Media	Baja
SSR	Co-dominante	Alta	Alta	Alta
ISSR	Dominante	Baja	Alta	Alta
SCAR	Co-dominante	Alta	Alta	Alta
CAPS	Co-dominante	Alta	Alta	Alta
SNP	Co-dominante	Alta	Alta	Muy alta
SRAP	Dominante	Alta	Alta	Alta
Secuenciación del ADN	Co-dominante	Alta	Alta	Muy alta

Marcador	Cantidad relativa de ADN necesario	¿Se necesita información de secuencia previa para el diseño de marcadores?	Enzima de restricción necesaria
RFLP	Alta	No	Si
RAPD	Baja	No	No
AFLP	Alta	No	Si
SSR	Baja	Si	No
ISSR	Baja	No	No
SCAR	Baja	Si	Si
CAPS	Baja	Si	Si
SNP	Baja	Si	No
SRAP	Baja	No	No
Secuenciación del ADN	Baja	Si	Si

Características de los marcadores ISSRs

Los ISSR son marcadores que permiten determinar la variación genética entre dos regiones microsatélites del mismo tipo que están dispersos en el genoma. Estas regiones se basan en repeticiones en tándem simples como $(CT)_n$ o $(CA)_n$, que están ubicadas entre secuencias no repetidas del genoma nuclear. Dichos marcadores son amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de oligonucleótidos que es complemento químico de un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di o trinucleótidos (González y Aguirre, 2007).

Cuando existen dos secuencias repetidas del mismo tipo dentro de una distancia amplificable y que presenta orientación invertida, el iniciador o primer complementario a estas puede inducir la amplificación del segmento de ADN intermedio. La molécula que se genera, y que presenta determinado peso molecular (tamaño), se considera como un “locus”, el cual será el representante del segmento de ADN entre los microsatélites. En algunos estudios, los ISSR pueden llegar a amplificar de 25 a 50 bandas por reacción, cuyo patrón característico del resultado de la PCR se le conoce como la “huella genética” del organismo estudiado (González y Aguirre, 2007).

Esta técnica ofrece la ventaja de centrarse en la enorme variación que detecta, así como su fácil reproducibilidad como consecuencia de las altas temperaturas utilizadas durante la PCR; aunque su alta funcionalidad puede depender del genoma de la especie, es decir, del tipo de microsatélites que predominen. Pueden ser visualizados en geles de agarosa o acrilamida, y no es necesario contar con altas concentraciones de ADN. Así mismo, para el diseño de “primers”, no es necesario conocer la secuencia del genoma de *P. infestans*. Por otro lado, la desventaja principal se basa en la incertidumbre sobre la homología de las bandas de amplificación; de igual forma, aunque se puede corregir estadísticamente, las estimaciones de heterocigosis poblacional pueden llegar a presentar un ligero sesgo (González y Aguirre, 2007).

Molina y colaboradores (2016) reportaron el uso de seis marcadores ISSR de la serie 800-900, procedentes de University of British Columbia Biotechnology Laboratory, 812, 880, 885, 888, 890 y 891 respectivamente, dadas sus cualidades aleatorias y universales; de los cuales, solo 3 marcadores (880, 888 y 890) generaron bandas de buena calidad para los aislados de *Phytophthora* spp. Aguilera y colaboradores (2011) reportan el uso de 10 marcadores ISSR para determinar la variabilidad genética en tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.), siendo los marcadores 810, 812, 835, 840, 841, 855, 884, 885, 888, 889, de los cuales, reportaron que solo el 810, 812, 840, 841, 885 y 888 generaron bandas de buena calidad.

Otro de los marcadores utilizados, es la virulencia, determinada mediante genes. Algunos patógenos producen ciertas moléculas llamadas efectores que manipulan la estructura y función de la célula del hospedero, con la finalidad de facilitar la infección. Los oomycetes segregan este tipo de efectores para lograr la colonización reprogramando molecularmente el circuito de defensa del hospedero. Existen genes de virulencia del patógeno (*Avr*), que pueden ser percibidos por el hospedero cuando se combinan con los genes *R* de resistencia de la planta (Guo, 2008).

Hasta la fecha se conocen 10 genes *Avr* de *P. infestans*, *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr4*, *Avrblb1*, *Avrblb2*, *Avrvnt1*, *AvrSmira1*, y *AvrSmira2* (Yin *et al.*, 2017), que codifican ciertas proteínas y tienen el objetivo de evadir mecanismos de defensa del hospedero, también conocidos como efectores RXLR. Estos mecanismos pueden presentar cambios en la posición del gen como resultado de una segregación por mutación, la inserción de trasposones, la recombinación mitótica y por genes extracromosomales (Izarra & Lindqvist, 2016).

Algunos efectores con actividad apoplástica son muy específicos para cierta función o mecanismo de defensa del hospedero, tal es el caso de EPIC1 y EPIC2, efectores segregados por *P. infestans* que inhiben la cisteína proteasa en el tomate. En los genes SCR74 y SCR91 se ve incrementada su expresión significativamente de dos a cuatro días después de la infección, teniendo una relación directa con la coevolución de la relación hospedero-patógeno (Kamoun, 2006). Por otro lado,

existen efectores citoplasmáticos de la familia de proteínas RXLR, específicamente ATR1, ATR13, AVR3a, y Avr1b, estos son específicos de oomicetos, que comienzan a segregar un gran número de proteínas derivados de una señal de focalización por parte de RXLR (péptido con función de señalización). Específicamente para *P. infestans*, aquellos aislamientos que son avirulentos para papa Ra3, portan el gen Avr3a C¹⁹K⁸⁰I¹⁰³, mientras que los aislados virulentos solo presentan el alelo de avr3a S¹⁹E⁸⁰M¹⁰³, donde existe una relación entre este par de genes, y donde predomina principalmente el gen avr3a en todos los aislados jugando un papel de patogenicidad importante para *P. infestans* (Kamoun, 2006).

En el genoma de *P. infestans*, los genes que son responsables de codificar a los efectores RXLR se encuentran distribuidos en las regiones dispersas que contienen los elementos transponibles (TE), caracterizados por tener baja densidad genómica, pero de gran abundancia de repeticiones, que están en constante evolución. Los ET mantienen una tendencia de acumularse en los alrededores de los genes implicados en la respuesta a la defensa, estrés y la respuesta a señales externas (Raffaele *et al.*, 2010).

De acuerdo con Pel (2010), se han determinado ciertos genes relacionados con mecanismos de defensas en especies de *Solanum* conocidos como genes R, los cuales guardan una relación estrecha con los genes Avr (patógeno), cuya expresión de resistencia o susceptibilidad depende de la cantidad de genes presentes en ambos. En condiciones naturales, las especies silvestres se han visto favorecidas en la expresión de los genes R, dando como resultado que ellas mismas pueden influir en los patrones de expresión de los genes que codifica el patógeno. En el cuadro 2 se muestran los principales genes relacionados a la expresión de *P. infestans* en hojas y tubérculos, considerando los iniciadores necesarios para su amplificación de acuerdo con el gen deseado.

Cuadro 2. Lista de marcadores utilizados para realizar análisis QRT-PCR en tejidos de hojas y tubérculos. (Pel, 2010).

Gen	Orientación del Primer	Secuencia del Primer	Temperatura de alineamiento (°C)	Accesion GenBank
<i>RI</i>	Forward	gggatcagattaccaaacct	60	AF447489
	Reverse	tagtgaggatatgtcacgagtg	...	...
<i>R3a</i>	Forward	ccggagtggaagcaatggg	60	AY849382
	Reverse	cttcaaggtagtgggcagtatgctt	...	...
<i>Rpi-blb3</i>	Forward	tgtcgctgaaagagatagacc	60	FJ536346
	Reverse	cacctttgccattggttag	...	...
<i>Rpi-vnt1.1</i>	Forward	atgaattattgtgtttacaagacttg	58	FJ423044
	Reverse	cagccatctcctttatttttc	...	...
<i>Efl α</i>	Forward	attggaaacggatatgtctcca	58-60	AB061263
	Reverse	tccttacctgaacgcctgtca	...	...
<i>Avr1</i>	Forward	aagaccgcagagtccaag	60	n.a.
	Reverse	tgatcctccacttaacagc	...	...
<i>Avr3a</i>	Forward	atgtggctgcgttgacggaga	60	AJ893356
	Reverse	tgagccccagggtgcacaggtta	...	...
<i>Avr2</i>	Forward	atgcgtctcgctacatttt	60	n.a.
	Reverse	aatcctctctcttctcgatc	...	...
<i>Avr-vnt1</i>	Forward	cgaagttgacggctcctg	60	n.a.
	Reverse	ggctcgctgaacaaatcc	...	...
<i>ef2 α</i>	Forward	gtcattgccacactctc	60	Torto <i>et al.</i> , 2002
	Reverse	catcatctgtcctcagc	...	...
<i>stRAR1</i>	Forward	atgatggaacgaagcagtg	58	AY615275
	Reverse	ttggtagcagatggtgttg	...	...
<i>stStg1</i>	Forward	tacgatgtgatgtctacc	58	AY679160
	Reverse	ttggtagcagatggtgttg	...	...
<i>stHSP90.2</i>	Forward	ccgacaagactaacaacac	58	NM_124985
	Reverse	gtcagcaaccaagtaagc	...	...
<i>stEDS1</i>	Forward	tctggtgtctggaatgttg	58	AY679160
	Reverse	aagaggagcaagcatcatc	...	...
<i>stNDR1</i>	Forward	gctctcttatctggctaagtc	58	AY615280
	Reverse	gattggatcttgtgtgttg	...	...
<i>HSR203J</i>	Forward	gtaatgatagtctcggttgataagc	60	AB200918
	Reverse	ggaagacggagacaataatagc	...	...

LITERATURA CONSULTADA

- Aguilera, Jorge G., & Barros, Everaldo G. de, & Silva, Derly J. H. da, & Elsayed, Ahmed Y., & Pessoni, Luiz A., & Rodrigues, Gabriel B. (2011). Genetic variability by ISSR markers in tomato (*Solanum lycopersicon* Mill.). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 6(2),243-252. ISSN: 1981-1160. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119018545009>
- Alor N.A. 2015. Caracterización de *Phytophthora infestans* y mejora genética para la resistencia en patata. Escola Técnica Superior d'Enginyeria Agrària. Universitat de Lleida, vol 14, pág. 54.
- Arafa, R. A., & Shirasawa, K. (2018). Technical review of molecular markers and next-generation sequencing technology to manage plant pathogenic oomycetes. *African Journal of Biotechnology*, 17(12), 369-379. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16304>
- Barquero, M., Gómez, L., & Brenes, A. (2005). Resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en materiales promisorios de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 29(3): 31-45. ISSN:0377-9424 / 2005. Pág. 32. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6779>
- Belmar-Díaz, C. R., & Lozoya-Saldaña, H. (2013). Incidencia de razas fisiológicas y genotipos de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en el valle de Toluca, México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 19(2), 173-181. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.04.025>
- CABI. (2021). Centre for Agricultural Bioscience International. Invasive Species Compendium. *Phytophthora infestans* (Phytophthora blight). Consultado en <https://www.cabi.org/isc/datasheet/40970>, Fecha de consulta: 13/03/2021.

- Cooke, L., R., Schepers, H., T., A., M. Hermansen, A., *et al.* 2011. Epidemiology and integrated Control of Potato Late Blight in Europe. *Potato Res.* 54, 183-222. <https://doi.org/10.1007/s11540-011-9187-0>
- Enciso Maldonado, G. A., Lozoya Saldaña, H., Díaz García, G., & López Salazar, A. (2021). La búsqueda de resistencia al tizón tardío en papas silvestres. *Investigaciones Y Estudios - UNA*, 12(2), 36–47. Recuperado a partir de <https://revistascientificas.una.py/index.php/rdgic/article/view/2034>
- González, A., & Aguirre, X. (2007). Inter simple sequence repeats (ISSRs). *Ecología Molecular. Compilado por Luis Eguarte, Valeria Souza y Xitlali Aguirre*, 567-571. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap19.pdf>
- Groves, C. T., & Ristaino, J. B. (2000). Commercial fungicide formulations induce in vitro oospore formation and phenotypic change in mating type in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 90(11), 1201-1208. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.11.1201>
- Grünwald, N. J., & Flier, W. G. (2005). The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 171-190. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906>
- Guo, J. (2008). *Phytophthora infestans* avirulence genes: mapping, cloning and diversity in field isolates. Wageningen University and Research. 138 pp.
- Izarra, M., & Lindqvist-Kreuzer, H. (2016). Expression of RXLR effectors in the EC-1 clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Peru. *Revista Peruana de Biología*, 23(3), 293-299. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v23i3.12864>
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 41-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436>

- Li, P., Cao, S., Dai, Y. L., Li, X. L., Xu, D. F., Guo, M., ... & Gao, Z. M. (2012). Genetic diversity of *Phytophthora capsici* (Pythiaceae) isolates in Anhui Province of China based on ISSR-PCR markers. *Genet Mol Res*, 11(4), 4285-4296. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012.December.17.4>
- Molina, S., Pérez-Martínez, S., Demey, J., Isturiz Zapata, M. A., & Sosa, D. (2016). Diversidad genética de *Phytophthora* spp. en plantaciones venezolanas de cacao mediante marcadores ISSR. *Revista de Protección Vegetal*, 31(1), 1-8. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000100001
- Pel, M. (2010). *Mapping, isolation and characterization of genes responsible for late blight resistance in potato*. Wageningen University and Research. 210 pp.
- Perez, W. (2008). *Manual técnico. El Tizón tardío de la papa*. International Potato Center Vol 1. ISBN 978-92-9060-343-6. Pp. 41. Consultado en https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=aHA57_Yv4-MC&oi=fnd&pg=PA7&dq=manual+tecnico+del+tizon+&ots=aTr5f1cJ3d&sig=h2Z9X2dydrm_S4BKt7ajplx-6s#v=onepage&q=manual%20tecnico%20del%20tizon&f=false
- Raffaele, S., Win, J., Cano, L. M., & Kamoun, S. (2010). Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. *BMC genomics*, 11(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-637>
- Shakya, S. K., Larsen, M. M., Cuenca-Condoy, M. M., Lozoya-Saldaña, H., & Grünwald, N. J. (2018). Variation in genetic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Mexico from the center of origin outwards. *Plant disease*, 102(8), 1534-1540. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1801-RE>

- Yin, J., Gu, B., Huang, G., Tian, Y., Quan, J., Lindqvist-Kreuze, H., & Shan, W. (2017). Conserved RXLR effector genes of *Phytophthora infestans* expressed at the early stage of potato infection are suppressive to host defense. *Frontiers in plant science*, 8, 2155. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02155>
- Zwankhuizen, M. J., Govers, F., & Zadoks, J. C. (1998). Development of potato late blight epidemics: Disease foci, disease gradients, and infection sources. *Phytopathology*, 88(8), 754-763. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.8.754>

**CAPITULO III. VARIABILIDAD GENETICA DE *Phytophthora infestans* y
ESPECIFICIDAD EN ESPECIES SILVESTRES DE PAPA.**

**CHAPTER III. GENETIC VARIABILITY OF *Phytophthora infestans* and
SPECIFICITY IN WILD POTATO SPECIES.**

Genetic variability and specificity of *Phytophthora infestans* in wild potato species

Variabilidad genética y especificidad de *Phytophthora infestans* en especies silvestres de papa.

Alfredo López Salazar¹, Héctor Lozoya Saldaña^{2*}, Ernestina Valadez Moctezuma², Santos Gerardo Leyva Mir¹.

¹Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México 56230

²Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México 56230

*Autor de correspondencia: e-mail: picti87gmail.com

RESUMEN

El tizón tardío es causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, organismo diploide heterotálico, cuya mutabilidad genética es enorme debido a su capacidad de reproducción sexual (tipo de compatibilidad A1 y A2). El objetivo de esta investigación fue determinar la variabilidad existente entre aislamientos obtenidos de seis especies silvestres de *Solanum* y precisar su posible especificidad; se realizó la extracción de ADN, y posteriormente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron 18 marcadores tipo ISSRs, obteniendo bandas de calidad con 11 de ellos, integrando la información y desarrollando un árbol de similitudes, donde cinco de los seis aislamientos presentaron diferencias. La especificidad se determinó haciendo inoculaciones en 11 materiales de *Solanum* con los seis aislamientos, obteniendo inconsistencias en incidencia y severidad, demostrando la enorme variación de este patógeno.

Palabras clave: *Solanum* spp., Tizón tardío, Valle de Toluca, variabilidad, especificidad.

ABSTRACT

Late blight is caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, heterothallic diploid organism, whose genetic mutability is enormous due to its sexual reproductive capacity (compatibility type A1 and A2). The objective of this research was to determine the variability between isolates obtained from six wild species of *Solanum* and to specify their possible specificity; DNA extraction was performed, and subsequently the polymerase chain reaction (PCR), 18 ISSRs markers were used, obtaining quality bands with 11 of them, integrating the information and developing a similarity tree, where five of the six isolates presented differences. Specificity was determined by inoculations in 11 *Solanum* materials with the six isolates, obtaining inconsistencies in incidence and severity, demonstrating the enormous variation of this pathogen.

Keywords: *Solanum* spp., Late Blight, Toluca Valley, variability, specificity.

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia alimenticia en el mundo, solamente superado por el arroz y el trigo (CIP, 2021). Este cultivo es afectado por el tizón tardío (TT), enfermedad que puede llegar a causar pérdidas de hasta el 100 % (Du *et al.*, 2015). El TT es causado por el oomiceto *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary perteneciente al reino Stramenopila (Chromista), Clase: Oomycetes. Se caracteriza por ser un organismo diploide heterotático, requiere los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) para reproducirse sexualmente, razón por la cual, las probabilidades de recombinación genética se han incrementado considerablemente, lo que ha ocasionado la aparición de cepas más agresivas (Whisson *et al.*, 2016). La estructura genética de una población es capaz de revelar el poder evolutivo que puede llegar a tener, y en este caso, la capacidad de generar una enfermedad como proceso de adaptación. Las poblaciones de *P. infestans* muestran una mayor probabilidad de evolución debido a que presentan altas tasas de mutación, son poblaciones muy grandes y tienen alto flujo de genes, entre otros (Guo, 2008). *P. infestans* ha mostrado de manera

constante una enorme diversidad genética, lo cual ha obligado a los investigadores a recurrir al uso de la resistencia genética vertical, derivada en su mayoría de *S. demissum*, *S. berthaultii* y *S. bulbocastanum*; sin embargo esta resistencia generada es específica a ciertas razas, sumado a lo anterior, se desconoce la relación que existe entre la variabilidad genética del patógeno y la variabilidad de la resistencia que presentan algunos hospedantes silvestres (Barquero *et al.*, 2005; Pérez, 2008). Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue determinar la variabilidad existente entre aislamientos obtenidos de seis especies de *Solanum* silvestres en el valle de Toluca, y precisar un posible sistema de especificidad patógeno-hospedero concluyendo sobre los diversos niveles de resistencia/susceptibilidad de las especies de *Solanum* y su relación con la agresividad de las cepas de *P. Infestans*.

MATERIALES Y METODOS

Durante los ciclos 2020 y 2021 se establecieron accesiones de seis especies de *Solanum* en las instalaciones del ICAMEX, Metepec, Estado de México bajo condiciones naturales de infección. En ambos años se hicieron evaluaciones semanales de severidad e incidencia mediante la escala Henfling, (1987), desde los 31 días después del trasplante hasta los 84 días después del mismo. Se aislaron seis cepas de *P. infestans* en medio centeno agar (Fernández *et al.*, 2020). La purificación del oomycete se realizó mediante la técnica de punta hifa.

ANALISIS MOLECULAR

Obtenidos los seis aislamientos, se raspó y agregó el micelio a un mortero, añadiendo nitrógeno líquido y se maceró inmediatamente para evitar su descongelamiento. El micelio triturado se transfirió a un tubo, que previamente se le habían adicionado 1.5 ml de Buffer de extracción y 0.2 % de BME precalentado a 65°C. Se agregaron 100 µL de SDS e incubó a 65°C por 20 minutos, mezclando ligeramente cada 10 minutos. Se agregaron 500 µL de Acetato de Potasio 5M, y posteriormente se incubó a -20°C. Las muestras se centrifugaron a 13,000 rev/min durante 2 minutos. Se agregó 0.7 vol de isopropanol al 100% y se mezcló

suavemente, incubando por 24 horas a -20°C. Se centrifugaron las muestras por 20 min a 13,000 rev/min, y después se decantó el sobrenadante. Se agregaron 100 µL de Buffer TE, 0.1 vol acetato de sodio 3M y 0.7 vol mezclando cuidadosamente. Se incubaron las muestras nuevamente por 12 horas a -20°C. Se centrifugaron por 10 min a 12,000 rev/min, posteriormente se agregaron 500 µL de Etanol al 70% centrifugando nuevamente. Los tubos se invirtieron para eliminar el etanol y se agregaron 100 µL de Buffer TE. Se incubaron las muestras a 4°C (Weising *et al.*, 2005).

La cantidad y calidad de ADN obtenido de cada muestra se estimó mediante espectrofotometría a 260 nm utilizando un espectrofotómetro UVS-99 (ACTGene). Se evaluaron 18 primers para generar marcadores tipo ISSRs de la serie 800-900, procedentes de University of British Columbia Biotechnology Laboratory, 809, 819, 822, 827, 829, 835, 862, 866, 875, 885, 888, 876, 878, 886, 892, 898, 850 y 844, obteniendo bandas de buena calidad con 11 de ellos (827, 829, 835, 862, 866, 885, 888, 876, 886, 898 y 850). La PCR se llevó a cabo en 1 termociclador Axygen Maxygen bajo la siguiente Condición: 1 ciclo: 95°C por 5 min, 30 ciclos: 94 °C por 1 min, 40 °C por 1 min, 72 °C, por 2:30 min, 1 ciclo: 72 °C, 10 minutos (extensión final). La separación del ADN se realizó mediante electroforesis en poliacrilamida 6%. Obtenidos los perfiles, se realizó una matriz binaria de datos en Excel mediante la encriptación, dando valor de “1” cuando hay una banda presente y un “0” cuando está ausente en los resultados de la electroforesis, para posteriormente ser cargada en el software NTSYSpc versión 2.21 y construir una matriz de similitud basada en distancias (coeficiente de variación) que cuantifica la relación entre individuos, mediante el método de remuestreo en las matrices de datos (Bootstrapping, 1000 veces) y el coeficiente de Jaccard. Se determinó la efectividad que tuvieron los marcadores ISSRs usados mediante el cálculo del número total de bandas, el total de bandas polimórficas, y los valores PIC (Polymorphism Information Content), Rp (Power of resolution) y MI (Marker index) mediante las fórmulas $PIC = 2f_i(1-f_i)$, $R_p = \sum I_b$, $I_b = 1 - (2x | 0.5-p|)$, $MI = (\%Pol) (PIC)$ respectivamente.

PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD

Se realizó la prueba de especificidad entre seis variantes de *P. infestans* y 11 especies de *Solanum* (*S. acaule*, *S. albicans*, *S. berthaultii*, *S. brevicale*, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. guerreroense*, *S. juzepczuckii*, *S. microdontum*, *S. pinnatisectum*, *S. stoloniferum*). Cada especie se inoculó con las seis variantes, se tomaron cinco hojas por especie, que previamente fueron lavadas con agua destilada, y desinfestadas con cloro comercial 2%, se colocaron dentro de un contenedor plástico, se agregó agua destilada estéril y se colocó papel aluminio como base para simular las condiciones de una cámara húmeda. Se acondicionaron seis cámaras húmedas correspondientes a cada variante de *P. infestans*. Dentro de cada cámara húmeda, se colocaron cinco hojas por especie de *Solanum*, a cada una se le agregó una gota de 20 µL de una solución preparada a partir de micelio triturado en 100 ml de agua destilada, a una concentración de 40,000 propágulos/ml (micelio) (Barquero *et al.*, 2005), calculado mediante un hematocitómetro. Se determinó la incidencia y severidad, haciendo evaluaciones una vez por día a las 72 horas de haber inoculado. Para este experimento se empleó un DCA, análisis de varianza y prueba de Tuckey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron promedios de los valores correspondientes a la variable severidad de los ciclos 2020-2021 (Cuadro 1) bajo condiciones naturales para las especies silvestres de *Solanum* evaluadas, posteriormente se realizó una curva de crecimiento y desarrollo de la enfermedad a través del tiempo en las distintas especies, como se observa en la figura 1. De acuerdo con los resultados, las especies *tuberosum* (tub), *vernei* (vrn), *albicans* (alb), *juzepczuckii* (juz), *acaule* (aca) y *microdontum* (mcd) tuvieron distinto grado de susceptibilidad al desarrollo de *P. infestans*, alcanzando el 100%, 85%, 72.5 %, 63.7%, 63.5% y 31.7% de severidad a los 46 ddt, respectivamente; En dicha evaluación, es evidente que la especie *microdontum* (mcd) fue quien presento menor susceptibilidad en

comparación con las demás, siendo la más tolerante de las 6 especies en ambos ciclos.

Cuadro 1. Severidad por especie, ciclos 2020 y 2021.

Especie	02-ago	12-ago	19-ago	27-ago	02-sep	10-sep	17-sep
acl	0	1.1	12.95	22.1	36.05	55.4	63.55
alb	0	1.9	7.9	21.25	33.75	47.5	72.5
juz	0	0	12.5	35	58.75	62.5	63.75
mcd	1.7	0.8	4.2	11.7	18.2	24.2	31.7
vrn	0	2.5	12.5	15	40	70.85	85
tub	0	6.7	18.3	40	71.7	91.7	100

Los datos corresponden a promedios de severidad por especie de los ciclos 2020-2021, expuestas a condiciones naturales. Se realizaron siete evaluaciones durante todo el ciclo, en lapsos de una semana entre evaluación obtenido resultados similares en ambos ciclos. Se confirmó el comportamiento y susceptibilidad de las especies de *Solanum* utilizadas sin variación alguna.

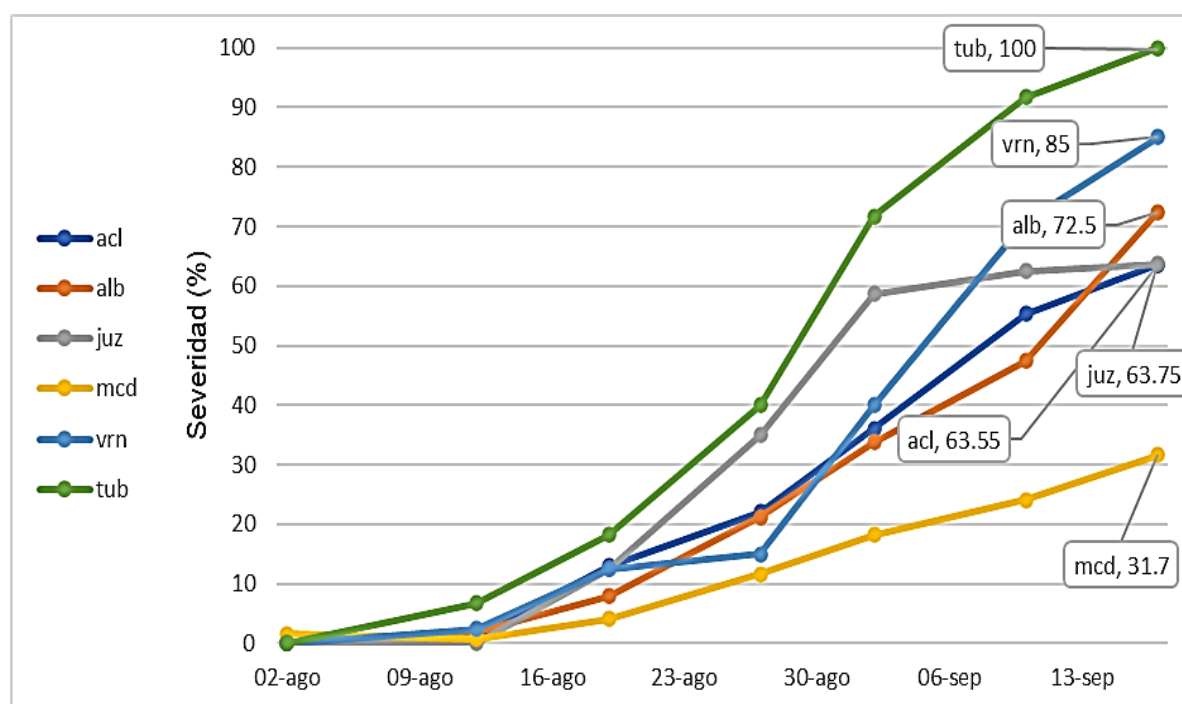


Figura 1. Curva de desarrollo de *Phytophthora infestans* a través del tiempo en especies silvestres de *Solanum*.

Lozoya *et al.*, 2006 reportó a *S. acaule* como una especie altamente susceptible contra *P. infestans* bajo condiciones naturales en el valle de Toluca, a pesar de ser considerada como una especie resistente. La severidad demostrada por esta especie en los ciclos 2020-2021 confirma dicha susceptibilidad con un 63.5 % de severidad. A pesar de que la resistencia vertical no es muy estable, existe un tipo de resistencia no específica determinada por numerosos genes o loci de rasgos cualitativos (QTL). En cruza intraespecíficas entre especies como *S. tuberosum*, *S. microdontum* y *S. vernei* han sido identificados QTLs que confieren cierta resistencia contra tizón; sin embargo, no son muy consistentes y dada la enorme variabilidad del oomycete, se reduce la resistencia (Nowicki *et al.*, 2012). *S. tuberosum* y *S. vernei* demostraron ser altamente susceptibles ante la enorme variabilidad del patógeno bajo condiciones naturales, *S. microdontum* demostró ligera resistencia con un 31.7% de severidad en comparación con las otras cinco especies, pudiendo tener relación directa con la presencia de QTLs.

A pesar de que son especies silvestres y que confieren cierta resistencia, los resultados obtenidos de severidad han demostrado que probablemente *P. infestans* haya logrado evadir los mecanismos de resistencia de las especies silvestres mediante efectores conocidos como RXRL o proteínas que son capaces de manipular la función celular del hospedero y facilitar la infección (Yin *et al.*, 2017, Guo, 2008).

ANALISIS MOLECULAR

Realizado el aislamiento del patógeno, y hecha la extracción, la cantidad de ADN obtenida de acuerdo con cada especie se enlista en el cuadro 2, cuyos valores fueron bajos en 2 aislamientos hechos en las especies Mcd y Juz debido al bajo desarrollo del patógeno; sin embargo, el parámetro relación 260/280 indicó que el ADN extraído fue de buena calidad; Las huellas de ADN ISSR obtenidas con los 11 iniciadores se muestran en el gel poliacrilamida 6% en la figura 2.

Cuadro 2. ADN de *P. infestans* obtenido de distintas especies silvestres de papa.

No.	Especie	Rendimiento	Absorbancia	Relación 260/280
1	Mcd	31.7 ng/ μ L	0.497	1.8
2	Juz	36.7 ng/ μ L	0.674	1.86
3	Alb	115.3 ng/ μ L	1.689	1.9
4	Tub	154.6 ng/ μ L	1.747	2.07
5	Acl	105.7 ng/ μ L	1.478	1.98
6	Vrn	131.9 ng/ μ L	1.657	2.05

Los productos de reacción de las 11 reacciones de PCR se separaron en geles de poliacrilamida 6%, se generaron 11 dendogramas correspondientes a 11 primers (827, 829, 835, 862, 866, 885, 888, 876, 886, 898 y 850) que fueron capaces de generar bandas de buena calidad.

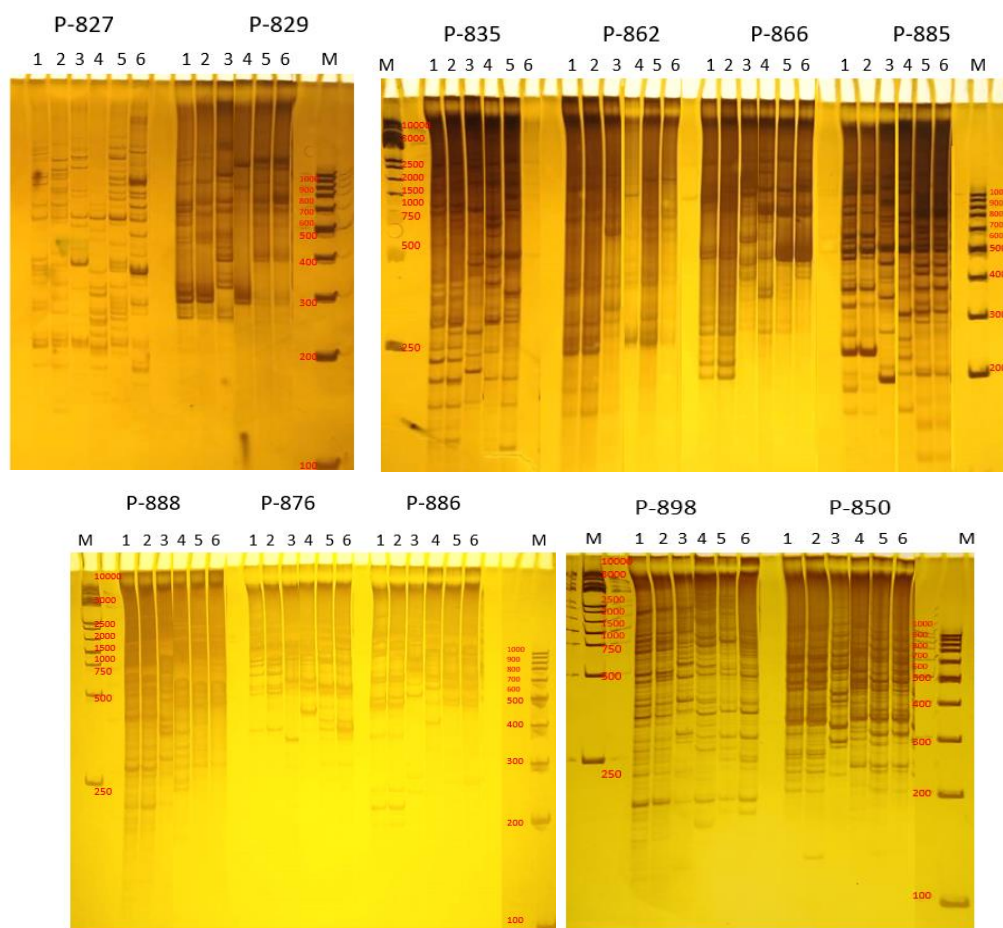


Figura 2. Huellas de ADN separadas en poliacrilamida de los productos de PCR de 6 aislamientos de *P. infestans*. 1(Mcd), 2 (Juz), 3 (Alb), 4(Tub), 5 (Acl) y 6 (Vrn).

Se realizó la integración de todas las matrices correspondiente a cada uno de los marcadores que amplificaron bandas de calidad, en el programa NTSYSpc2.2. El método de remuestreo utilizado fue Bootstrap (remuestreo en 1000 veces), obtenido un árbol más consistente, como se muestra en la figura 3. Se incorporó el nombre de la especie y su porcentaje de susceptibilidad que presentó cada especie durante su evaluación en campo.

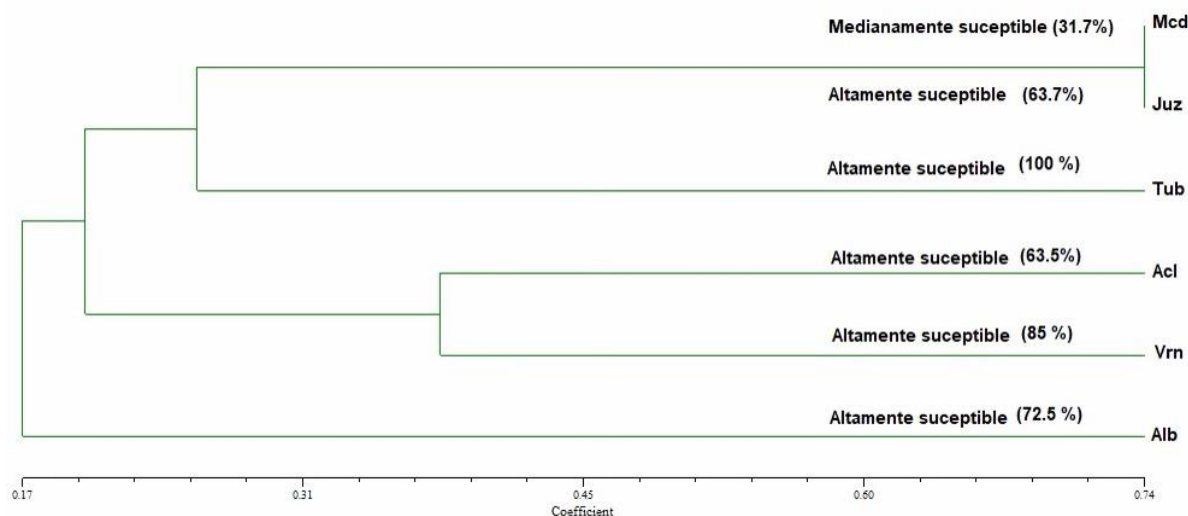


Figura 3. Distancias fenotípicas entre aislamientos de *P. infestans* desarrollado en distintas especies silvestres de *Solanum*.

Los aislamientos de *P. infestans* provenientes de las especies *microdontum* (Mcd) y *juzepczuckii* (Juz), de acuerdo con los resultados obtenidos en la construcción del dendrograma, son prácticamente similares mostrando un bajo coeficiente de variación, aunque la susceptibilidad en ambas especies fue distinta, alcanzando un mayor porcentaje en Juz con un 63% de severidad, mientras que en Mcd tuvo 31%. Dicha variación puede deberse a diversos factores, sin embargo, se estima que la principal razón sea la presencia de mayor-menor cantidad de genes de resistencia. A excepción de los aislamientos de Mcd y Juz, las variantes restantes muestran diferencias entre sí en cuanto a distancia que cuantifica la relación entre individuos; algunas de ellas ligeramente emparentadas con otras. El aislamiento de *S. tuberosum* (Tub) es el más cercano a la relación Mcd y Juz, y por ende presenta cierta similitud; a la semejanza anterior se añade la existente entre los aislamientos

de Acl y Vrn, cuya similitud es similar entre estas acorde a su coeficiente de variación, cuyas severidades fueron altas, con 63% y 85%, respectivamente.

Shakya *et al.*, (2018) demostraron que a pesar de considerar al valle de Toluca como el posible centro de origen de *P. infestans*, existe un enorme flujo genético y reproducción sexual desde el centro del país hacia las demás regiones estudiadas llegando a genotipar aislamientos trisómicos e incluso tetrasómicos; sin embargo, el valle de Toluca sigue siendo un referente para la evaluación de esta variabilidad.

Se encontraron diferencias significativas en la caracterización fenética realizada entre los seis aislamientos hechos de las especies silvestres en el valle de Toluca; sin embargo, dos de ellas de acuerdo con el análisis son similares, pero presentan distinto grado de severidad ocasionado, pudiéndose deber a la enorme variabilidad genética que confiere ciertos genes para evadir la resistencia del hospedero. Flier *et al.*, (2003) evaluó la estructura poblacional de *P. infestans* en el valle de Toluca, analizando 170 aislamientos obtenidos de especies silvestres, infiriendo que las diferencias entre las poblaciones evaluadas del patógeno están impulsadas también por ciertos genes (R) distribuidos en las especies silvestres evaluadas, lo cual incrementa potencialmente la variabilidad genética de este oomycete, cuyo resultado es observable en este estudio.

Evaluación de la eficiencia de los iniciadores

Respecto a los parámetros considerados para determinar la funcionalidad de los iniciadores para PCR utilizados, el Polymorphism Information Content (PIC), es un valor que indica la capacidad de los iniciadores de PCR para la amplificación de marcadores moleculares, cuya cifra está en función del número de alelos que están presentes en un locus determinado y su frecuencia, obteniendo valores máximos de hasta 0.5. Una vez realizada la matriz binaria se determinó el poder discriminante de cada marcador. El cálculo de esta variable se realizó mediante la fórmula (González *et al.*, 2016; Reyes *et al.*, 2016; De Riek *et al.*, 2001):

- $PIC = 2f_i(1-f_i)$

Donde:

PIC: Contenido de información polimórfica.

fi: frecuencia de los fragmentos del primer que están presente.

1-fi: frecuencia de los fragmentos del primer que están ausentes.

Power of resolution (Pb) o poder de resolución es un valor que estima la distribución que tienen los alelos en el genotipo del organismo analizado. Al tener un gran número de genotipos, se puede estimar la habilidad de un primer para poder distinguirlos, mediante la suma de esos valores ajustados haciendo uso de la formula (Prevost y Wilkinson, 1999; Reyes et al., 2016):

- $R_p = \sum I_b$

Donde:

Ib: Informatividad de la banda o su posición en particular.

Para el cálculo de Ib se utilizó la siguiente formula:

- $I_b = 1 - (2x | 0.5 - p|)$

Donde:

p: Proporción de genotipos que presentan la banda.

Marker Index (MI) o Índice del marcador es un valor cuyo principal uso es la estimación en general sobre la eficiencia y utilidad que puede llegar a generar un marcador molecular. Se define como el resultado del producto entre el Polymorphism Information Content (PIC) y el porcentaje de polimorfismo para cada primer (Kesari *et al.*, 2010; Sorkheh *et al.*, 2007).

- $MI = (PIC)(\%Pol)$

Donde:

PIC: Contenido de información polimórfica

% Pol: Porcentaje de polimorfismo

Obteniendo los siguientes datos del cuadro 3.

Cuadro 3. Evaluación de la capacidad y eficiencia de los marcadores usados.

Tipo de marcador	Primer	Secuencia	Total de bandas	Bandas polimórficas	% de Polimorfismo	PIC	RP	(MI)
ISSRs Serie 800-900	850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	27	27	100 %	0.33	13.75	33
	827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	24	24	100 %	0.34	11.5	34
	829	TGT GTG TGT GTG TGT GC	19	19	100 %	0.25	6.75	25
	835	AGA GAG AGA GAG AG AGY C	25	25	100 %	0.29	10.25	29
	862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC	14	14	100 %	0.24	5	24
	866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	14	14	100 %	0.33	6.5	33
	885	vBv ATA TAT ATA TAT AT	30	30	100 %	0.29	12.25	29
	888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	17	17	100 %	0.30	7.25	30
	876	GAT AGA TAG ACA GAC A	15	15	100 %	0.31	7.25	31
	886	vDv CTC TCT CTC TCT CT	21	21	100 %	0.28	8.5	28
	898	GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G	22	22	100 %	0.42	15.25	42
Promedio				20.6	100 %	0.30	9.47	30.7
Total			228	228				

De acuerdo con el análisis realizado, los resultados obtenidos en el cuadro 3 muestran a los 11 marcadores ISSRs con un 100 % de polimorfismo produciendo un total de 228 bandas. Al contemplar el 100 % de polimorfismo, el número generado de bandas total por primer es igual al número de bandas polimórficas que contiene cada uno, con rangos desde las 14 bandas presentadas por los marcadores 862 y 866, hasta 30 bandas por el marcador 885. El contenido de información polimórfica (PIC) tuvo oscilaciones entre 0.24 (marcador 862) y 0.42 (marcador 898) considerando aquellos cercanos a 0.5 los mejores, en función del número de alelos y su frecuencia, siendo el marcador 898 el mejor. El poder de resolución (RP) tuvo variaciones, oscilando entre 5 (marcador 862) y 15.25 (marcador 898), en donde se consideraron aquellos marcadores con una gran

capacidad para distinguir los genotipos, los cuales fueron el 898, 850 y 885 que presentaron los valores más altos de Rp (15.25, 13.75 y 12.25 respectivamente). Finalmente, el índice del marcador (MI) osciló entre 24 (marcador 862) y 42 (marcador 898), variable que determinó que marcador arrojó datos más concisos, considerando al marcador 898 como el mejor de acuerdo con los valores estimados; los marcadores 827 y 850 también fueron considerados marcadores de buena calidad para este estudio, generando información precisa y confiable.

PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD

La toma de datos de variables incidencia y severidad se realizó de acuerdo con la metodología hecha por Barquero *et al.*, 2005, a las 72 horas de haber realizado la inoculación obteniendo los siguientes datos. Dado que se tuvieron 4 repeticiones y un testigo, se obtuvo un promedio de dichas variables.

Cuadro 4. Especificidad demostrada en función de incidencia y severidad.

<i>P. infestans</i> aislada de la especie: ↓	Especies silvestres inoculadas										
	<i>S. acaule</i>	<i>S. albicans</i>	<i>S. berthaultii</i>	<i>S. brevicaule</i>	<i>S. chacoense</i>	<i>S. demissum</i>	<i>S. guerrerense</i>	<i>S. juzepczuckii</i>	<i>S. microdontum</i>	<i>S. pinnatisectum</i>	<i>S. stoloniferum</i>
<i>S. tuberosum</i>	*I: 100 % *S: 17.5%	I: 100% S: 73.7 %	I: 100 % S: 7.5 %	I: 100% S: 12.5 %	I: 100 % S: 8.7 %	I: 100% S: 17.5 %	I: 50% S: 3.7 %	I: 25% S: 2.5 %	I: 100% S: 67.5 %	I: 100 % S: 13.7 %	I: 0% S: 0%
<i>S. acaule</i>	I: 100 % S: 20 %	I: 100% S: 78.7 %	I: 0% S: 0%	I: 0% S: 0%	I: 0% S: 0%	I: 0% S: 0%	I: 100% S: 10%	I: 0% S: 0%	I: 75% S: 6.2 %	I: 0% S: 0%	I: 0% S: 0%
<i>S. albicans</i>	I: 0% S: 0%	I: 100 % S: 40%	I: 25% S: 10%	I: 0% S: 0%	I: 0% S: 0%	I: 25% S: 6.2%	I: 0% S: 0%	I: 100% S: 23.7 %	I: 100% S: 30%	I: 0% S: 0%	I: 0% S: 0%
<i>S. vernei</i>	I: 100 % S: 12.5 %	I: 100% S: 90%	I: 100% S: 16.2 %	I: 100% S: 5%	I: 0% S: 0%	I: 75% S: 6.2%	I: 25% S: 3.7%	I: 100% S: 16.7 %	I: 100% S: 13.7 %	I: 100% S: 100%	I: 0% S: 0%
<i>S. microdontum</i>	I: 0% S: 0%	I: 100% S: 77.5%	I: 50% S: 23.7%	I: 25% S: 10%	I: 0% S: 0%	I: 0% S: 0%	I: 75% S: 30%	I: 75% S: 11.2 %	I: 100% S: 13.7 %	I: 100% S: 35%	I: 75% S: 12.5%
<i>S. juzepczuckii</i>	I: 100% S: 17.5%	I: 100% S: 66.2 %	I: 100% S: 28.7 %	I: 0% S: 0%	I: 50% S: 2.5 %	I: 0% S: 0%	I: 0% S: 0%	I: 100% S: 28.7 %	I: 0% S: 0%	I: 100% S: 60%	I: 0% S: 0%

. *I: Incidencia, *S: Severidad (promedio acumulado hasta la última de evaluación).

De acuerdo con los valores anteriores, se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada aislamiento de *P. infestans* con cada una de las especies inoculadas de *Solanum*, donde es perceptible la variabilidad de desarrollo de esta patógeno bajo las mismas condiciones. Se presentan a continuación en las siguientes figuras:

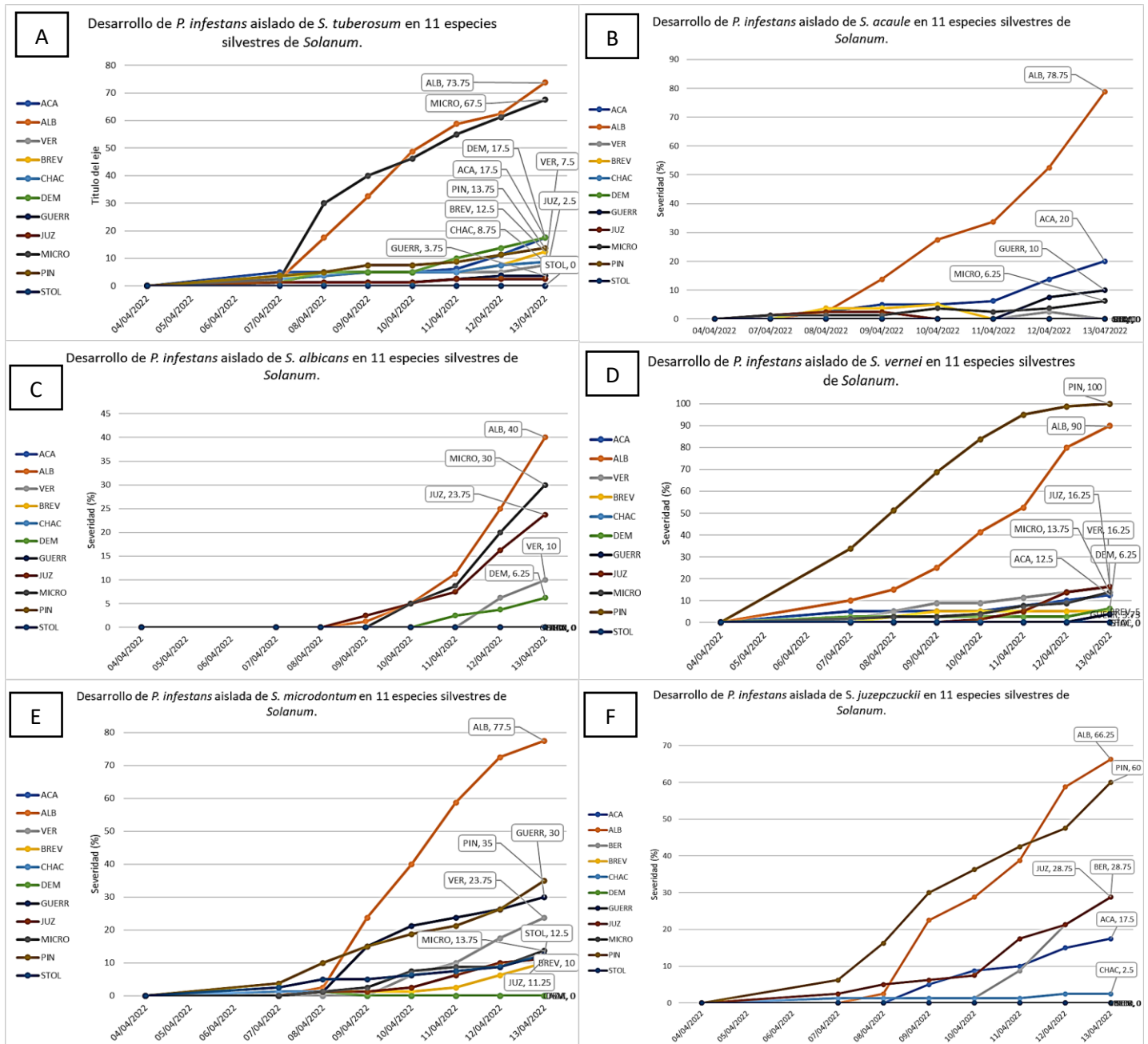


Figura 4. Curvas de desarrollo de aislamientos hechos de las especies silvestres: (A) *S. tuberosum*, (B) *S. acaule*, (C) *S. albicans*, (D) *S. vernei*, (E) *S. microdontum* y (F) *S. juzepczukii*

Cada una de las gráficas representa el desarrollo de *P. infestans* aislado de una especie silvestre de *Solanum*. A pesar de ser el mismo patógeno, la enorme variabilidad genética derivada principalmente de la reproducción sexual ha generado que existan distintos grados de severidad en cada uno de los hospederos; el oomycete aislado de *S. microdontum* y *S. juzepczuckii*, de acuerdo con las curvas, tuvo un mayor grado de incidencia y severidad en las 11 especies afectando a siete especies y seis especies en mayor proporción, respectivamente. El patógeno aislado de *S. albicans* presentó un desarrollo similar en cuanto al número de especies afectadas, aunque en menor proporción de incidencia y severidad. Finalmente, la especie más susceptible en este ensayo fue *S. albicans*, pues con los seis aislamientos, presentó un alto porcentaje de incidencia y severidad, seguido de *S. pinnatisectum*, *S. microdontum* y *S. acaule*. Dos de las especies consideradas altamente resistentes (*S. demissum* y *S. guerreroense*) presentaron signos de la enfermedad, derivada del probable vencimiento de la resistencia por ciertos efectores (proteínas que son codificadas por genes Avr) segregados por el patógeno (Leesutthiphonchai *et al.*, 2018).

Vleeshouwers *et al.*, (1999) realizó evaluaciones sobre la resistencia que ofrecían especies de *Solanum* con resistencia parcial, concluyendo que los 20 genotipos de plantas analizados tuvieron resultados similares tanto en condiciones de campo como laboratorio. Las condiciones de incubación posterior a la inoculación fueron más determinantes en sí que el desprendimiento de las hojas al momento de presentar síntomas, afectando la expresión de la resistencia. En este trabajo, las condiciones posteriores a la inoculación fueron similares, simulando una cámara húmeda y logrando cierto grado de desarrollo del patógeno acorde la resistencia.

Barquero *et al.*, (2005) determinó la resistencia a este oomycete en 83 genotipos en folíolos desprendidos en condiciones de laboratorio. Las hibridaciones provenientes de *Solanum circaefolium*, *S. bulbocastanum* y *S. okadae* presentaron menor severidad de la enfermedad; sin embargo, especies como *S. pinnatisectum* y *S. berthaultii* que también fueron evaluadas en el presente trabajo, desarrollaron severidades altas, corroborando la susceptibilidad de estas mismas.

Se realizó un análisis estadístico para determinar la varianza y comparación de medias (Tuckey) existente entre los tratamientos establecidos para cada inoculación de *P. infestans*, obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 5. Comparación de medias entre tratamientos, *S. albicans*.

Variedades	N	Media Agrupación
2	28	11.79 A
9	28	9.11 A B
8	28	7.86 A B C
3	28	2.32 B C
6	28	1.79 B C
11	28	0.000000 C
10	28	0.000000 C
7	28	0.000000 C
5	28	0.000000 C
4	28	0.000000 C
1	28	0.000000 C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 6. Comparación de medias entre tratamientos, *S. tuberosum*.

Variedades	N	Media Agrupación
9	28	43.21 A
2	28	42.32 A
10	28	8.214 B
6	28	8.21 B
1	28	7.857 B
4	28	6.071 B
5	28	5.357 B
3	28	5.000 B
7	28	2.143 B
8	28	1.786 B
11	28	0.000000 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 7. Comparación de medias entre tratamientos, *S. acaule*.

Variedades	N	Media Agrupación
2	28	29.82 A
1	28	7.68 B
9	28	2.857 B
7	28	2.500 B
4	28	1.786 B
8	28	0.893 B
3	28	0.357 B
11	28	0.000000 B
10	28	0.000000 B
6	28	0.000000 B
5	28	0.000000 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 8. Comparación de medias entre tratamientos, *S. vernei*.

Variedades	N	Media Agrupación
10	28	75.89 A
2	28	44.82 B
3	28	9.29 C
1	28	7.143 C
9	28	5.75 C
8	28	5.18 C
4	28	3.929 C
6	28	3.036 C
7	28	0.536 C
11	28	0.000000 C
5	28	0.000000 C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 9. Comparación de medias entre tratamientos, *S. microdontum*.

Variedades	N	Media Agrupación
2	28	39.29 A
10	28	18.57 B
7	28	16.79 B C
3	28	8.21 B C D
11	28	6.79 B C D
9	28	6.07 B C D
8	28	4.64 B C D
4	28	3.39 C D
5	28	0.357 D
6	28	0.179 D
1	28	0.000000 D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Cuadro 10. Comparación de medias entre tratamientos *S. juzepczuckii*.

Variedades	N	Media Agrupación
10	28	34.11 A
2	28	31.07 A
8	28	12.68 B
3	28	9.11 B
1	28	8.04 B
5	28	1.607 B
11	28	0.000000 B
9	28	0.000000 B
7	28	0.000000 B
6	28	0.000000 B
4	28	0.000000 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

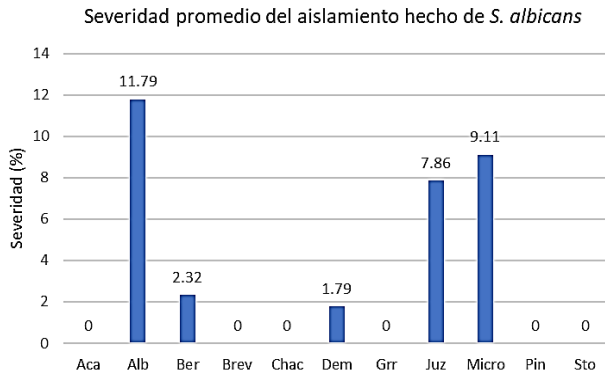


Figura 5. Comparación de medias entre tratamientos, *S. albicans*.

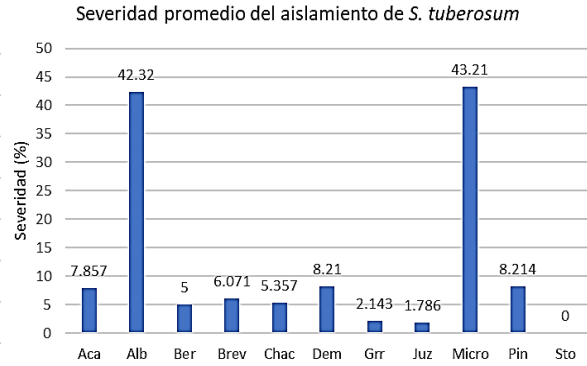


Figura 6. Comparación de medias entre tratamientos, *S. tuberosum*.

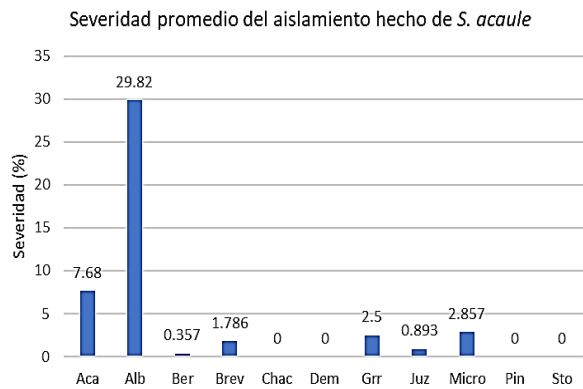


Figura 7. Comparación de medias entre tratamientos, *S. acaule*.

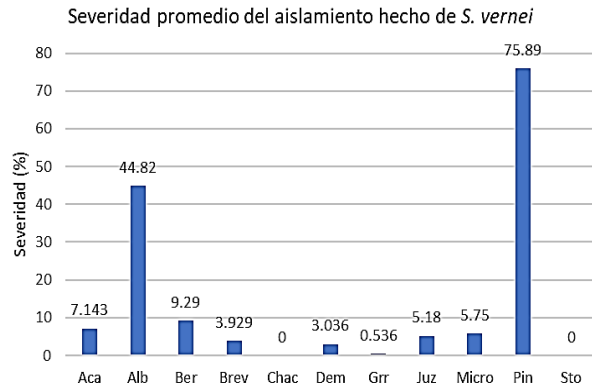


Figura 8. Comparación de medias entre tratamientos, *S. vernei*.

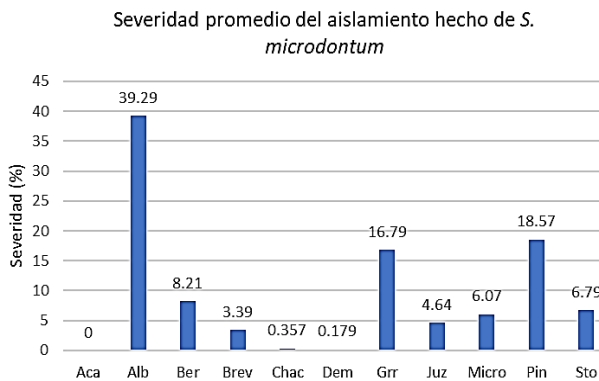


Figura 9. Comparación de medias entre tratamientos, *S. microdontum*.

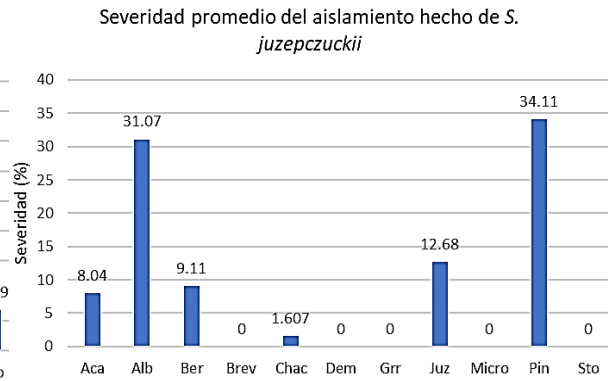


Figura 10. Comparación de medias entre tratamientos, *S. juzepczuckii*.

De acuerdo con el análisis hecho, se puede observar en el cuadro cinco y en la figura cinco correspondientes al aislamiento hecho de *S. albicans*, que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, catalogando a la variedad dos (*S. albicans*) como la más susceptible con un 11.79% de severidad, seguida de la variedad nueve (*S. microdontum*) y la variedad ocho (*S. juzepczuckii*). Posteriormente la siguiente agrupación generada estadísticamente fue la variedad tres (*S. berthaultii*) y la variedad seis (*S. demissum*) con un comportamiento similar en cuanto a severidad se refiere; finalmente las especies restantes tuvieron un comportamiento similar.

Para el aislamiento hecho de *S. tuberosum* (cuadro 6, figura 6), estadísticamente solo se generaron dos grupos que mostraron diferencias significativas, siendo la variedad nueve (*S. microdontum*) y la variedad dos (*S. albicans*) las más susceptibles con un 43.21% y 42.32% de severidad, respectivamente, el resto de las variedades se comportó estadísticamente similar.

El aislamiento de *P. infestans* obtenido de *S. acaule* (cuadro 7, figura 7) tuvo bajo impacto de severidad en la mayoría de las especies, estadísticamente la única especie susceptible fue la variedad dos (*S. albicans*) con una media de 29.82 % de severidad, aunque también menor proporción como se ve en la figura siete, la variedad uno (*S. acaule*).

Se generaron 3 grupos estadísticamente diferentes de acuerdo con la comparación de medias para el aislamiento hecho de *S. vernei*, de acuerdo con el cuadro ocho y figura 8, la variedad 10 (*S. pinнатisectum*) fue la especie más susceptible a este aislamiento con un 75.89%; posteriormente se encuentra la especie dos (*S. albicans*) dentro de las más susceptibles. El resto de las variedades se comportó estadísticamente similar en cuanto a su susceptibilidad a este aislamiento.

El aislamiento obtenido de *S. microdontum* generó cuatro grupos estadísticamente distintos (cuadro nueve), nuevamente la variedad dos (*S. albicans*) demostró ser la especie más susceptible con una media de severidad de 39.29 %, posteriormente la variedad 10 (*S. pinнатisectum*) fue quien demostró menor susceptibilidad, seguido de la variedad siete (*S. guerreroense*) y la variedad tres (*S. berthaultii*) como se

observa en la figura ocho. Finalmente, las demás variedades se comportaron estadísticamente igual.

Para el aislamiento de *S. juzepczuckii* estadísticamente se generaron dos grupos con diferencias significativas (cuadro 10), la variedad 10 (*S. pinnatisectum*) fue la más susceptible, con una media de 34.11% de severidad; seguido de la variedad dos (*S. albicans*) con 31.07 %. De acuerdo con el análisis, aunque en la figura 10 se observa cierta variación, estadísticamente las demás especies se comportaron ligeramente similar en cuanto a la susceptibilidad demostrada a este aislamiento.

Chen *et al.*, (2008) evaluó la especificidad generada entre el hospedero y la variación poblacional de 177 aislamientos generado por AFLPs de *P. infestans* en tomate y papa; sin embargo, todos los aislamientos fueron agresivos con los hospederos, encontrando nula correlación entre el polimorfismo y las poblaciones evaluadas. A pesar de haber demostrado nuevamente la enorme variabilidad genética de este patógeno, las evaluaciones hechas en esta investigación presentan inconsistencias. Cada especie demostró diferente severidad antes las inoculaciones hechas. Flier *et al.*, (2007) menciona que la variabilidad patogénica de los aislamientos también está determinada por los genes R del hospedero, lo cual incrementa la posibilidad de tener mayor variabilidad, pero al mismo tiempo distintas respuestas inmunes.

La detección de ciertos patrones moleculares que están asociados a determinada enfermedad puede ser detectados por el hospedero. La planta a través de receptores reconoce dichos patrones. Un patrón característico de *P. infestans* es el ácido araquidónico y la Pep 13, que al ser reconocido por el sistema inmune del hospedero (Genes R), desencadena la producción de fitoalexinas, alcaloides, fenoles, etc., en el caso de aquellas especies que tuvieron baja susceptibilidad. Por otro lado, aquellas especies silvestres que tuvieron severidades e incidencias altas fueron vencidas por los efectores (proteínas que evaden los mecanismos de defensa del hospedero) segregados por este oomyceto (Leesutthiphonchai *et al.*, 2018; Raffaele *et al.*, 2010).

Chen et al., (2018) informó sobre la expresión del gen StPOTHR1 en *S. tuberosum*, el cual está asociado a la resistencia a *P. infestans*, activándose específicamente en zonas de inoculación y mejorando la defensa contra el desarrollo de este patógeno. Los estudios realizados revelan que este gen está localizado en la membrana plasmática y sufre múltiples modificaciones posteriores a la transcripción. StPOTHR1 coopera con la resistencia ofrecida a este oomycete, pudiendo estar relacionado con la activación de las cascadas de MAP quinasa, moléculas asociadas a estímulos de tipo estrés bióticos y abióticos. Siendo una explicación a la inconsistencia de las severidades desarrollada por las especies de *Solanum* evaluadas.

CONCLUSIONES

Las poblaciones de *P. infestans* han presentado una enorme variabilidad principalmente como resultado de la reproducción sexual, los tipos de reproducción (A1 y A2) son los responsables de esta variabilidad y la generación de cepas más agresivas que han logrado, mediante ciertos efectores, la evasión de los mecanismos de defensa generados por los hospederos a través de los genes R. Es importante determinar las variaciones y similitudes como posibles fuentes de información para el control genético del Tizón, inclusive si existe una estrecha relación entre la virulencia de algún aislamiento y la resistencia específica de cada especie silvestre evaluada. Es necesario llevar a cabo la secuenciación del genoma de estas variantes aisladas para determinar cuáles y cuantos genes están involucrados en el desarrollo de la enfermedad específicamente en estas especies de *Solanum*, y descartar o corroborar un posible vencimiento de la resistencia ofrecida por las mismas.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto de colaboración internacional Cornell - Europa del Este - México (CEEM) sobre el control del tizón tardío de la papa y PICTIPAPA por el financiamiento del trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de manutención.

Al ICAMEX por favorecer el uso de sus instalaciones para el desarrollo del experimento/fase de campo.

A la Universidad Autónoma Chapingo, a los departamentos de Parasitología Agrícola y Departamento de Fitotecnia por el material, personal de laboratorio y apoyo brindado para llevar a cabo dicha investigación.

LITERATURA CONSULTADA

- Barquero, M., Gómez, L., & Brenes, A. (2005). Resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en materiales promisorios de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 29: 31-45 Consultado en <http://www.revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/download/6779/6466>
- Chen, C.-H., Sheu, Z.-M., & Wang, T.-C. (2008). *Host Specificity and Tomato-Related Race Composition of Phytophthora infestans Isolates in Taiwan During 2004 and 2005*. *Plant Disease*, 92(5), 751–755. doi:10.1094/pdis-92-5-0751
- Chen, Q., Tian, Z., Jiang, R., Zheng, X., Xie, C., & Liu, J. (2018). StPOTHR1, a NDR1/HIN1-like gene in *Solanum tuberosum*, enhances resistance against *Phytophthora infestans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 496(4), 1155-1161. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.162>
- CIP (2021). International Potato Center - Papa. Consultado en: <https://cipotato.org/es/potato/>, Fecha de consulta: 23/02/2021.
- De Riek, J., E. Calsyn, I. Everaert, E. Van Bockstaele. (2001). De Loose AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theor Appl Genet*, Vol. 103: 1254–1265. <https://doi.org/10.1007/s001220100710>
- Du, J., Verzaux, E., Chaparro-Garcia, A., Bijsterbosch, G., Keizer, L. P., Zhou, J., ... & Van Der Vossen, E. A. (2015). Elicitin recognition confers enhanced resistance to *Phytophthora infestans* in potato. *Nature plants*, 1(4), 1-5. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.34>
- Fernández, P., S., P., Diaz, C., M., Rodríguez, A., G., Gómez, D., N., Gloria, A., Z., Félix, G., R., Ochoa, A., S., Garay, S., E., Mondragón, F., A., Soto, P., A., Grünwald, N., J., Santillán, M., R. (2020) Manual de laboratorio de *Phytophthora*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 84 pp.

- Flier, W. G., Grünwald, N. J., Kroon, L. P., Sturbaum, A. K., van den Bosch, T. B., Garay-Serrano, E., ... & Turkensteen, L. J. (2003). The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca valley of central Mexico suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology*, 93(4), 382-390.
- González Chavarro, C. F., León Lozano, M. E., Morillo Coronado, A. C., Ochoa, E. I., & Morillo Coronado, Y. (2016). Caracterización molecular de palma de aceite *Elaeis guineensis* Jacq., procedente de diferentes orígenes (Zaire y Camerún) usando marcadores microsatélites. *Acta Agronómica*, 65(3), 276-283. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v65n3.48413>
- Guo, J. (2008). *Phytophthora infestans* avirulence genes: mapping, cloning and diversity in field isolates. Wageningen University and Research. 138 pp.
- Henfling, J. W. (1987). Late blight of potato (Vol. 4). *International Potato Center. Lima (Perú)* 25 pp.
- Kesari, V., Madurai Sathyanarayana, V., Parida, A., & Rangan, L. (2010). Molecular marker-based characterization in candidate plus trees of *Pongamia pinnata*, a potential biodiesel legume. *AoB Plants*, 2010. 17 (3): 342-349 <https://doi.org/10.1093/aobpla/plq017>
- Leesutthiphonchai, W., Vu, A. L., Ah-Fong, A. M., & Judelson, H. S. (2018). How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. *Phytopathology*, 108(8), 916-924. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0130-IA>
- Lozoya-Saldaña, H., Perales-Rosas, D., Fernández-Pavía, S. P., & Grünwald, N. J. (2006). Characterization of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. II. Subpopulations obtained from wild *Solanum* species. *Agrociencia*, 40(3), 325-333.

- Nowicki, M., Foolad, M. R., Nowakowska, M., & Kozik, E. U. (2012). Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant disease*, 96(1), 4-17. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0458>
- Pérez, W. (2008). *Manual técnico. El Tizón tardío de la papa*. International Potato Center Vol 1. ISBN 978-92-9060-343-6. Pp. 41. Consultado en https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=aHA57_Yv4-MC&oi=fnd&pg=PA7&dq=manual+tecnico+del+tizon+&ots=aTr5f1cJ3d&sig=h2Z9X2dydrm_S4BKt7ajplx-6s#v=onepage&q=manual%20tecnico%20del%20tizon&f=false
- Prevost, A. & M. J., Wilkinson. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet*, Vol. 98:107- 112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
- Raffaele, S., Win, J., Cano, L. M., & Kamoun, S. (2010). Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. *BMC genomics*, 11(1), 1-18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-637>
- Reyes-Alemán, J. C., Valadez-Moctezuma, E., & Barrientos-Priego, A. F. (2016). Assessment of genetic relationship in *Persea* spp. by traditional molecular markers. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1-11. doi: 10.4238/gmr.15027359
- Shakya, S. K., Larsen, M. M., Cuenca-Condoy, M. M., Lozoya-Saldaña, H., & Grünwald, N. J. (2018). Variation in genetic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Mexico from the center of origin outwards. *Plant disease*, 102(8), 1534-1540. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1801-RE>
- Sorkheh, K., Shiran, B., Gradziel, T. M., Epperson, B. K., Martínez-Gómez, P., & Asadi, E. (2007). Amplified fragment length polymorphism as a tool for molecular characterization of almond germplasm: genetic diversity among cultivated genotypes and related wild species of almond, and its

relationships with agronomic traits. *Euphytica*, 156(3), 327-344
<https://doi.org/10.1007/s10681-007-9382-x>

Vleeshouwers, V. G., van Dooijeweert, W., Paul Keizer, L. C., Sijpkens, L., Govers, F., & Colon, L. T. (1999). A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation. *European journal of plant pathology*, 105(3), 241-250.
<https://doi.org/10.1023/A:1008710700363>

Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press. 447 pp.

Whisson, S. C., Boevink, P. C., Wang, S., & Birch, P. R. (2016). The cell biology of late blight disease. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 127-135. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.09.002>

Yin, J., Gu, B., Huang, G., Tian, Y., Quan, J., Lindqvist-Kreuze, H., & Shan, W. (2017). Conserved RXLR effector genes of *Phytophthora infestans* expressed at the early stage of potato infection are suppressive to host defense. *Frontiers in plant science*, 8, 2155. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02155>

ANEXOS Y PROTOCOLOS

ANEXO 1 OBTENCIÓN DEL INOCULO

Muestreo

Ciclo 2021

Se realizó un muestreo en un lote establecido en las instalaciones del ICAMEX, con dirección en Conjunto SEDAGRO s/n, Rancho San Lorenzo, 52140 Metepec, Méx. El muestreo fue de foliolos y tallos necrosados y con presencia de esporulación, característicos de *P. infestans*. En el lote estuvieron establecidos los materiales correspondientes a 14 especies de papas silvestres. Algunas especies estuvieron constituidas por 3 accesiones (distintas muestras de semilla), pero siendo la misma especie. Cada una de ellas, de acuerdo con resultados en el ciclo 2020, tuvo distinto grado de tolerancia (baja, mediana y alta). Fueron establecidas cinco plantas por accesión.

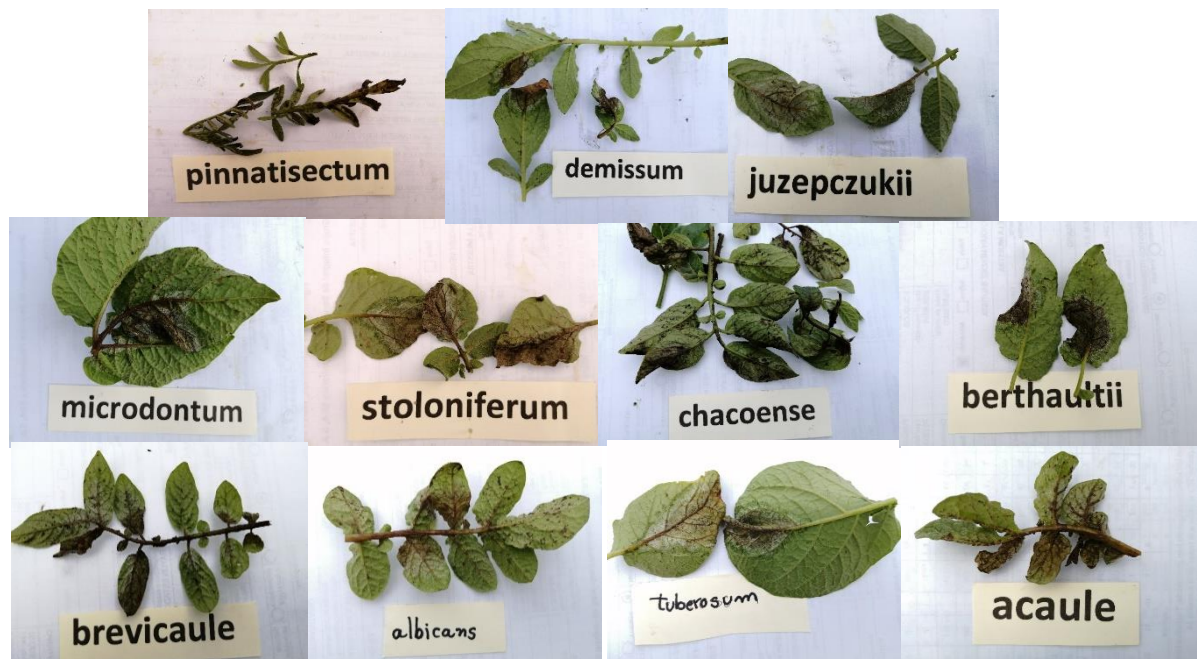


Figura 11. Materiales recolectados con daños característicos ocasionados por *P. infestans*.

Cuadro 11. Materiales establecidos en el ciclo 2021. (El porcentaje corresponde al grado de susceptibilidad a *P. infestans* mostrado el ciclo anterior).

No.	Especie	Accesión	No. Plantulas
1	<i>S. acaule</i> (acl)	*631192 (100%), **653812 (89.7%), ***653814 (85%)	15
2	<i>S. albicans</i> (alb)	*631198 (99 %), ***631199 (65%)	10
3	<i>S. berthaultii</i> (ber)	*653801 (99 %), **653802 (95 %), ***653829 (10%)	15
4	<i>S. brevicaula</i> (brc)	*653818 (100 %), **653817 (45 %), ***631209 (5%)	15
5	<i>S. chacoense</i> (chc)	*631200 (100 %), **653766 [90 % (2019), 100% (2020)], ***653822 [55 % (2019), 100% (2020)]	15
6	<i>S. demissum</i> (dem)	*653789 (35 %), ***653762 (0 %), ***653805 (0%)	15
7	<i>S. guerreroense</i> (grr)	***653828 (0 %)	5
8	<i>S. juzepczukii</i> (juz)	*631201 (100%)	5
9	<i>S. microdontum</i> (mcd)	*631212 (85%), ***631211 (15%)	10
10	<i>S. michoacanum</i> (mch)	**653810 (85 %)	5
11	<i>S. pinnatisectum</i> (pnt)	*653808 (94.3%), **275230 (41.7%), ***653791 (11.7%)	15
12	<i>S. stoloniferum</i> (sto)	*249929 (100%), **631216 (45%), ***653794 (15 %)	15
13	<i>S. verrucosum</i> (ver)	*653784 (100%)	5
14	<i>S. vernei</i> (vm)	*473306 (100%)	5
Total			150 plantas



Figura 12. Lote del establecimiento de materiales genéticos ciclo 2021.



Figura 13. Siembra e identificación de las accesiones.

De cada especie se tomó una muestra (cinco plantas), fue determinante que el trabajo de muestreo se llevó a cabo durante las primeras horas de la mañana, cuando las condiciones temperatura (15°C) y humedad ($<80\%$) fueron las adecuadas. La esporulación generalmente se da en el envés, aunque dependiendo de la severidad del daño, fue posible observar daños en ambas caras de las hojas. Cada muestra se etiquetó y guardó en bolsas herméticas en obscuridad a una temperatura cercana a los 5°C .



Figura 14. Síntomas característicos para tomar muestras de cada especie.

Preparación de medio de cultivo selectivo

Medios de cultivo

Existen distintos medios de cultivo, los mas más utilizados son 3-P (P-pimaricina, P-Penicinila, P-Polimixina B, CARP (C-cornmeal agar , A-ampicilina, R-rifamicina, P-pimaricina), PARPH, PARP, PARPH, PVP (P-pimaricina, A-ampicilina, R-rifampicina, P-pentacloronitrobenceno, H-himexazol, V-vancomicina), CARPD (D-dicloran), CARP+ (+-benlato e himexazol), donde la principal diferencia es la concentración de antibióticos y algunos fungicidas para la inhibición del desarrollo de organismos que puedan contaminar el medio. Algunos que son específicos para *P. infestans* son a base de Agar Centeno, aunque también puede utilizarse Papa Dextrosa Agar (PDA) (Soto *et al.*, 2017).

Se siguió el siguiente protocolo para los primeros aislamientos.

Centeno Agar

Es recomendado para las especies *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. ipomoeae*, que generalmente no crecen en los medios convencionales, por lo cual para este medio se requiere harina de centeno:

Cuadro 12. Preparación del medio.

Centeno-Agar

Glucosa (azúcar comercial)	15 g
Harina de centeno	20 g
Agar	15 g
Agua	Aforar a 1 L

Agregar los componentes y esterilizar (Fernández *et al.*, 2020).

Dado que fue necesario evaluar el desarrollo de *P. infestans*, se optó por preparar avena agar para observar y comparar en que medio se desarrolló mejor.

Avena Agar

Cuadro 13. Preparación del medio.

Avena	60 g
Agar	12 g
Extracto de levadura (opcional)	2 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

Agregar los componentes y esterilizar (Fernández *et al.*, 2020).

Procedimiento

Para ambos medios de cultivo se siguió el mismo procedimiento con los componentes correspondientes. En 500 ml de agua destilada se puso a hervir la base del medio (20 g de centeno o 60 g de avena) durante 30 minutos. Centrifugar durante 20 minutos a 2500 revoluciones por minuto, decantar y juntar el líquido sobrante, filtrando la infusión a través de manta de cielo para clarificar la solución colada (Fernández *et al.*, 2020).

La infusión fue colocada en una probeta de 1000 ml, y se aforó hasta completar el volumen total (1 L), previamente en dos matraces Erlenmeyer se agregó el agar (10 gr por matraz, en el caso de la preparación de centeno se debe agregar a cada matraz 7.5 gr de azúcar comercial); la infusión se agregó a cada matraz (500 ml) disolviendo el agar, mezclado perfectamente (Fernández *et al.*, 2020).

Obtenida la solución, se procedió a esterilizar en autoclave durante 20 min a 15 psi.



Figura 15. Preparación de medio de cultivo avena agar.



Figura 16. Centrifugación de la solución para lograr un medio más puro.

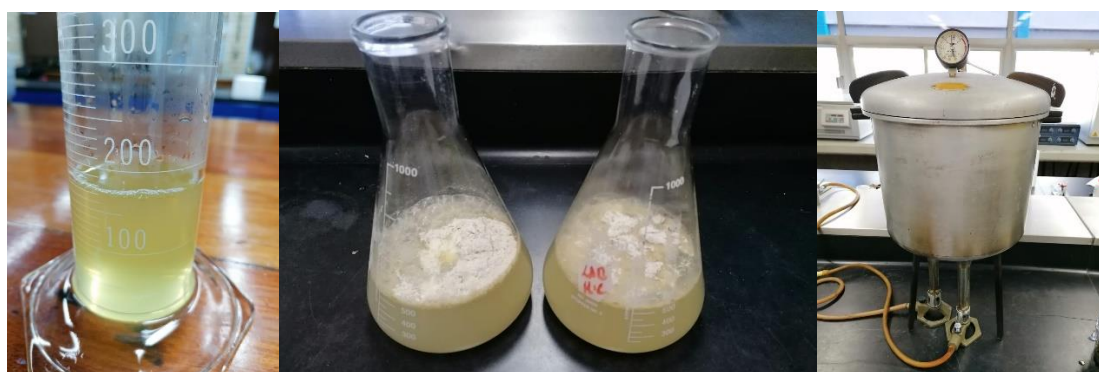


Figura 17. Obtención de una solución más pura, mezcla con componentes finales y su posterior esterilización.

Aislamiento de *Phytophthora*

Las muestras obtenidas se procesaron un día después de haber sido colectadas para evitar el desarrollo de otros organismos que no son de interés. Se desinfectó el tejido superficialmente con agua corriente. Posteriormente se hizo uso de una solución de hipoclorito de sodio al 3% sumergiendo el tejido durante 30 segundos, para posteriormente lavar con agua destilada estéril, finalmente dejándolas secar en papel filtro estéril. El tiempo de desinfestación puede variar de acuerdo con el tejido que se va a trabajar, así como también la sensibilidad que se puede presentar hacia el cloro varía entre las distintas especies de *Phytophthora*, aunque se pueden realizar la siembra directa del tejido si desinfectar, y posteriormente se purifica. (Soto *et al.*, 2017).



Figura 18. Contenedores usados para cámara húmeda.

Se hizo uso de contenedores plásticos para la colocación de la muestra (Cámara húmeda), los cuales fueron lavados con agua y jabón, posteriormente desinfectados con alcohol.



Figura 19. Desinfestación del tejido vegetal.

Esporulación, inoculación y siembra en medio de cultivo

Se colocaron las muestras de tejido dañado dentro de una cámara húmeda (Contenedor plástico donde se agregó agua, se puso una base flotante de aluminio para colocar las muestras de tejido vegetal), con la finalidad de preservar las condiciones ideales de desarrollo del patógeno en cuanto a temperatura y humedad, y que estas sean constantes hasta formar esporangios. Una vez realizado el proceso anterior, se hizo uso de tubérculos de papa para la inoculación, cada papa fue lavada con agua y jabón, posteriormente se desinfestó con cloro comercial (hipoclorito de sodio al 2 %), posteriormente se enjugaron con agua destilada estéril y se rociaron con etanol al 80 %, dejando secar. Se colocó el tejido vegetal dañado en la cámara húmeda, separando e identificado a cada especie silvestre. Se cortaron rodajas de no más de medio centímetro y se colocarán por encima del tejido dañado con la finalidad de filtrar a *P. infestans*. Las rodajas de papa pasaron así por las próximas 72 horas hasta desarrollar esporangios y micelio, descartando

el tejido vegetal dañado usado previamente con la finalidad de evitar el desarrollo de patógenos no deseados.



Figura 20. Colocación del tejido dañado en cámara húmeda.



Figura 21. Rodajas de papa colocadas por encima del tejido dañado con la finalidad de “filtrar” a *P. infestans*.

Después de 4 días, comenzó a desarrollarse micelio en las rodajas de papa colocadas encima de cada muestra.



Figura 22. Desarrollo de micelio después de más de 72 horas de haber sido colocada la rodaja de papa en tejido dañado.

En condiciones asépticas, haciendo uso de mecheros de Bunsen, se procedió a transferir el micelio a cajas Petri con medio específico (Avena agar y centeno agar), observando un crecimiento similar en ambos. Con una aguja de disección esterilizada, se tomó parte del micelio y se transfirió a las cajas, sembrando 3 puntos para su adecuado desarrollo.



Figura 23. Transferencia de micelio a medio de cultivo.

Este procedimiento se repitió suficientes veces hasta observar el desarrollo del micelio totalmente puro, dado que, en las primeras siembras, hubo contaminación por organismos que no son de interés de estudio.



Figura 24. Desarrollo de micelio en medio de cultivo centeno agar.



Figura 25. Desarrollo de *P. infestans* aislado de *S. demissum* y *S. acaule* en centeno agar.



Figura 26. Uso de microscopio estereoscópico para la siembra de las puntas de hifa.

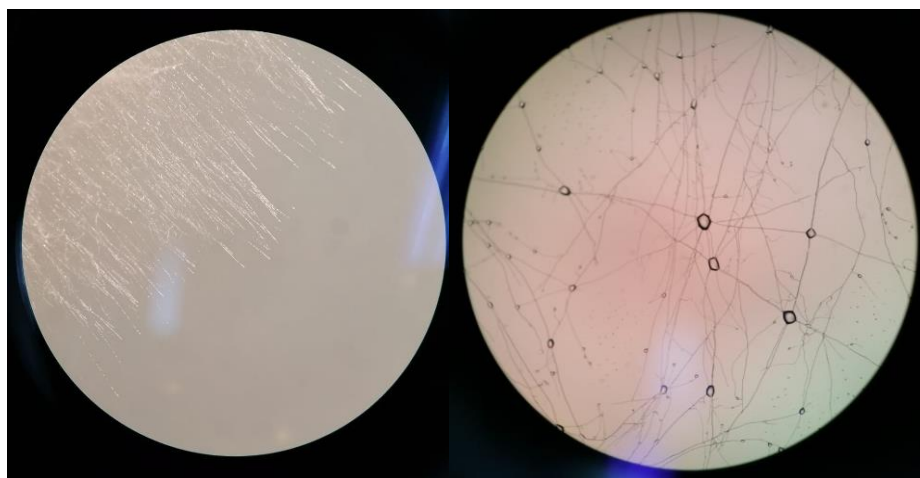


Figura 27. Desarrollo de las hifas para la siembra.

Dado que los aislamientos ya purificados de *Phytophthora* se incuban a una temperatura inferior a la del ambiente, se debe asegurar que no esté contaminado por bacterias. Se puede realizar una prueba rápida, usando medio líquido LB, se colocan 3 cuadros de agar con micelio procedentes de 3 puntos distintos de una colonia en un tubo con medio LB estéril en un volumen de dos ml. Una vez que entran en contacto, los tubos se incuban en lugar cálido con la finalidad de promover el desarrollo de bacterias si es que existen. Las observaciones se hacen a las 24-48 horas, la interpretación de resultados se hace en función de lo turbio que se torna el medio, si es turbio, habrá presencia de bacterias.

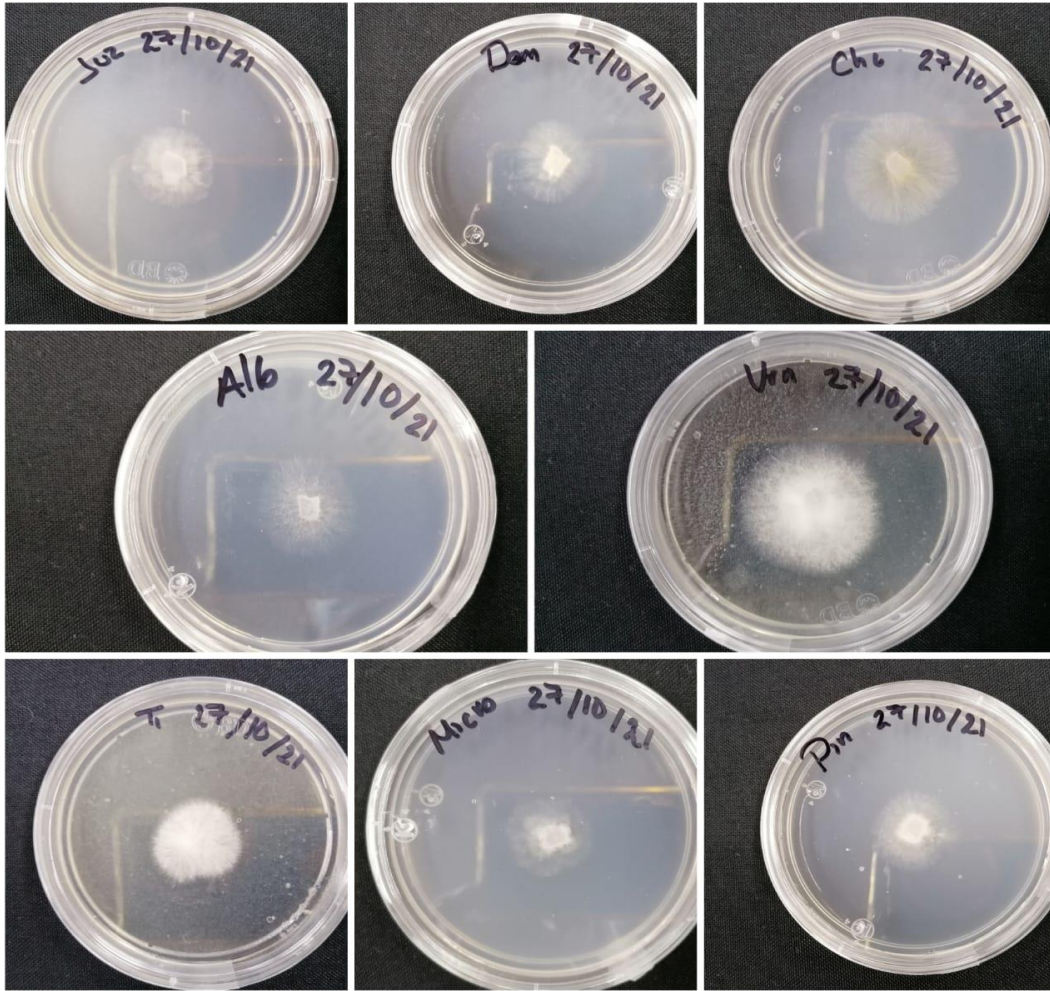


Figura 28. Desarrollo de aislamientos de *P. infestans* de distintas especies de *Solanum*.

ANEXO 2. EXTRACCION DE ADN

De las muestras obtenidas, se realizó la extracción de ADN correspondiente a cada uno de los aislamientos de *P. infestans* (Weising *et al.*, 2005.)

1. Se raspó el micelio usando una espátula y colocándolo en un mortero previamente esterilizado y conservado en frío. Una vez en el mortero se agregó nitrógeno líquido e inmediatamente se maceró el tejido evitando el descongelamiento como se muestra en la figura 22.



Figura 29. Transferencia de micelio a mortero, y su posterior maceración; preparación de reactivos para extracción.

2. El tejido triturado se transfirió inmediatamente a un tubo, el cual contenía 1.5 ml de Buffer de extracción y 0.2 % de BME precalentado a 65°C.

3. Se agregaron 100 μ L de SDS e incubó a 65°C por 20 minutos, mezclando ligeramente cada 10 minutos.

4. Se agregaron 500 μ L de Acetato de Potasio 5M mezclando bien, para posteriormente incubar en frío (-20°C) para que proteínas y polisacáridos se precipiten en conjunto, dejando los ácidos nucleicos en la solución.

5. Se centrifugaron las muestras a 13,000 rev/min durante 20 minutos.

6. Se agregó 0.7 vol de isopropanol al 100% enfriado previamente y mezclando suavemente.

7. Posteriormente se incubaron durante una hasta 24 horas a -20°C .
8. Se centrifugaron las muestras por 20 minutos a 13,000 rev/min. Posteriormente se decantó el sobrenadante teniendo cuidado de no perder la pastilla de DNA, e invirtiendo los tubos durante 1 hora.
9. Se agregaron 100 μL de Buffer TE para redissolver la pastilla. Se agregarón 0.1 vol acetato de sodio 3M y 0.7 vol de isopropanol, siendo 10 μL y 70 μL respectivamente, y se mezcló cuidadosamente.
10. Se incubaron las muestras a -20°C durante 1 hora o toda la noche.
12. Se centrifugaron por 10 min a 12,000 rev/min, posteriormente descartando la solución de lavado y se agregaron 500 μL de Etanol al 70%, centrifugando nuevamente.
13. Se invirtieron los tubos y se escurrió el etanol durante una hora, posteriormente se agregó Buffer TE (dependiendo del tamaño de la pastilla, se consideró 50 μL , 80 μL o 100 μL para pastillas de menor a mayor tamaño respectivamente)
14. Se incubaron las muestras a 4°C .

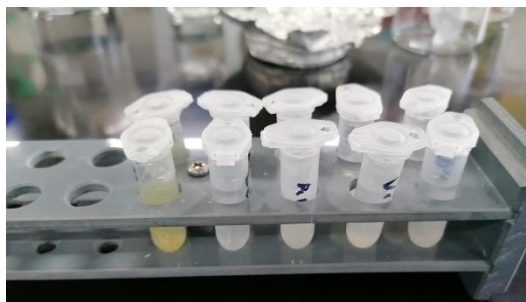


Figura 30. Obtención de muestras de ADN de *P. infestans*.

Cuantificación de calidad de ADN

1. Se utilizó un Nanodrop ND-1000, seleccionado la opción “Nucleic acid”, y desplegando el menú de análisis.
2. Previo hacer uso del equipo, se limpió el pedestal y la celda con dos μL de agua HPLC, y posteriormente agregando dos μL de Buffer TE para realizar la previa calibración del equipo. Una vez colocada la muestra de TE, en el programa se seleccionó la opción de “Blank” para calibrar el equipo y dejar en “cero” el lector. Cada 10 muestras se calibró el equipo nuevamente con Buffer TE.
3. Se tomaron dos μL de cada muestra de DNA y se colocaron haciendo uso de una micropipeta estéril, teniendo cuidado de no generar burbujas al colocar la muestra.
4. Colocada la muestra se cerró la tapa, y se da clic en la opción “Measure” en el programa para iniciar la lectura.
5. Obtenido el análisis, fue importante estimar la cantidad y calidad de DNA expresada en $\text{ng}/\mu\text{L}$, la absorbancia, y la relación 260-280, parámetros que son importantes para determinar la calidad de DNA.

Cuadro 14. Resultados estimados de cantidad y calidad de ADN de aislamientos de *P. infestans* provenientes de ocho especies silvestres de *Solanum*.

Especie	Rendimiento	Absorbancia	Relación 260/280
Micro	31.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$	0.497	1.8
Juz	36.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$	0.674	1.86
Alb	115.3 $\text{ng}/\mu\text{L}$	1.689	1.9
Dem	20.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$	0.406	1.54
Tub	154.6 $\text{ng}/\mu\text{L}$	1.747	2.07
Aca	105.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$	1.478	1.98
Vrn	131.9 $\text{ng}/\mu\text{L}$	1.657	2.05
Pin	104.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$	1.450	1.81

Preparación de diluciones

Se hizo preparación de diluciones a partir de los resultados anteriores, a una concentración final de 20 ng/μL.

Se utilizó la formula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

C_1 ----- Concentración inicial

V_1 ----- Volumen inicial

C_2 ----- Concentración final

V_2 ----- Volumen final

Dado que el volumen final que se necesito fue de 150 μL, se ajustó el resto del volumen con agua HPLC.

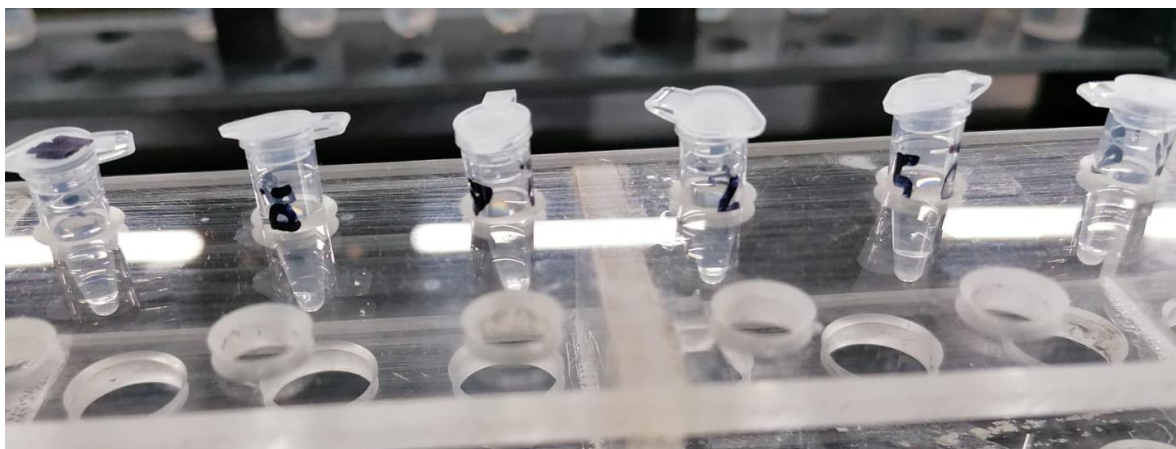


Figura 31. Obtención de diluciones de cada muestra de DNA 20 ng/μL.

Preparación de mezcla de reacción Master mix (MaMi)

Los datos del cuadro 15 corresponden a las cantidades necesarias de reactivos para llevar a cabo **una reacción**.

Cuadro 15. Reactivos necesarios, volumen necesario, y concentración para preparación de MaMi.

Reactivo	Concentración del stock.	Vol. tomado del stock.	Concentración final del volumen tomado del stock.	Volumen total para 11 rxns (MAMI).
DNA	100 ng	5 µL**	20 ng/µL	-
Iniciadores	10 pM	2 µL	20 pM	22 µL
Buffer	5X	5 µL	1X	55 µL
MgCl ₂	25 mM	3 µL	3 mM	33 µL
dNTPs	500 mM	10 µL	200 mM	110 µL
Taq DNA pol	5 U/µL	0.3 µL	1.5 U	3.3 µL
*Agua HPLC	-	-	-	-
Total		25.3 µL		228.3 µL

*En caso de ajustar el volumen de la reacción, se puede jugar con el volumen de agua.

**El DNA de cada muestra se adiciona al final a la mezcla de reacción cuando ésta fue preparada mediante una MaMi (Mezcla de Reacción para varias reacciones con la misma concentración de reactivos).

Por cada 10 reacciones se consideró 1 más por si existieran errores de pipeteo.

Se calculo la cantidad de reactivo en µL utilizando la formula $C_1 V_1 = C_2 V_2$

Cada tubo para reacción deberá contener 25 µL

Buffer $C_1 V_1 = C_2 V_2$

$$(5x) (x) = (1x) (25 \mu\text{L}) \quad x = 5 \mu\text{L}$$

MgCl₂ **C₁ V₁ = C₂ V₂**

$$(25 \text{ n}\mu) (x) = (3 \text{ n}\mu) (25 \text{ }\mu\text{L}) \quad x = 3 \text{ }\mu\text{L}$$

dNTPs **C₁ V₁ = C₂ V₂**

$$(500 \text{ m}\mu) (x) = (200) (25 \text{ }\mu\text{L}) \quad x = 10 \text{ }\mu\text{L}$$

Taq DNA pol **C₁ V₁ = C₂ V₂**

$$((1.5 \text{ U}) (1\mu\text{L})) / 5 \text{ U} \quad x = 0.3 \text{ }\mu\text{L}$$

La suma de todos los reactivos fue 25 μL , incluyendo el ADN que fue la cantidad estipulada en el paso anterior.

Obtenida la mezcla de reacción, el volumen total se dividió en 11 partes (a excepción del DNA que en cada tubo se colocaran cinco μL (100 ng) para nuestras condiciones), posteriormente se realizó la PCR. De preferencia agregar la Taq polimerasa y el DNA al final.

Iniciadores

Los iniciadores utilizados fueron para marcadores ISSRs de la serie 800-900, de los cuales se usaron:

Cuadro 16. Lista de iniciadores ISSRs.

Núm.	SERIE	Tm°	SECUENCIA
1	850	45	GTG TGT GTG TGT GTG TYC
2	844	39.4	CTC TCT CTC TCT CTC TRC
1	809	42.9	GAG AGA GAG AGA GAG AT
2	819	47.7	GTG TGT GTG TGT GTG TA
3	822	45.9	TCT CTC TCT CTC TCT CA
4	827	54.9	ACA CAC ACA CAC ACA CG
5	829	56.4	TGT GTG TGT GTG TGT GC
6	835	42.7	AGA GAG AGA GAG AG AGY C

7	862	68.7	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
8	866	60.5	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
9	875	41.1	CTA GCT AGC TAG CTA G
10	885	41.7	vBv ATA TAT ATA TAT AT
11	888	44	BDB CAC ACA CAC ACA CA
12	876	36.4	GAT AGA TAG ACA GAC A
13	878	56	G G A T G G A T G G A T G G A T
14	886	36.9	vDv CTC TCT CTC TCT CT
15	892	56.3	TAG ATCT GAT ATC TGA ATT CCC
16	898	54.1	GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G

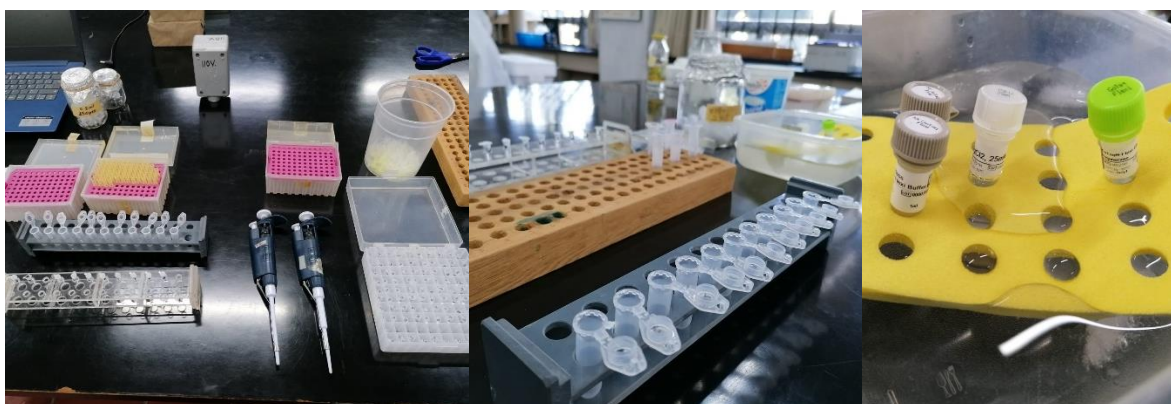


Figura 32. Reactivos y preparación de la MASTER MIX por primer.

PCR

El procedimiento se realizó en dos termocicladores con 1 condición de termociclaje (alineamiento) para ambos, ya que las temperaturas de alineamiento de algunos iniciadores fueron variadas, pero se promediaron las temperaturas.

Condición: 1 ciclo: 95°C por 5 min, 30 ciclos: 94 °C por 1 min, 40 °C por 1 min, 72 °C, por 2:30 min, 1 ciclo: 72 °C, 10 minutos (extensión final).

Colocadas las muestras, se procedió a correr el programa. Una vez finalizadas las reacciones, las muestras obtenidas se conservaron a una temperatura inferior a los

5°C. Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa y/o poliacrilamida.



Figura 33. Reacciones para introducir en el termociclador, y su posterior programación.

Preparación de geles de agarosa

1. Se preparo in gel de agarosa al 1%; para lo cual se pesó un gramo y se incorporó en 100 ml de buffer TE.
2. La agarosa se disolvió en un horno de microondas dando pulsos de cinco a diez segundos hasta observar que se disolvió por completo.
3. Cuando la mezcla tenía una temperatura promedio de 40°C, se vació en el portageles de la cámara de electroforesis con el peine de 20 cerdas previamente colocado, hasta su solidificación.
4. Posteriormente se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con amortiguador TAE IX.
5. En una gradilla para ELISA, para cada muestra de PCR obtenida, se agregaron siete μL de colorante y cinco μL de DNA, se mezcló con una micropipeta utilizando una punta nueva para cada muestra.

6. Se retiró el peine cuidadosamente, y se colocaron las muestras en los pozos correspondientes. Bordeando las muestras, se colocaron dos μL de marcador de peso molecular de 1kb, a una concentración de 125 ng/ μL .

7. Posteriormente, se colocó la tapa. Se encendió la fuente de poder y se mantuvo entre 80 y 90 volts durante la electroforesis. Realizado lo anterior, se colocó la tapa con sus respectivos electrodos. Este proceso puede variar en cuanto a su duración (de 40 hasta 90 minutos).

8. Finalizado el proceso anterior, el gel se sumergió en bromuro de etidio por alrededor de 15 minutos, y después se transfirió a un recipiente que contenía agua destilada por 15 min para eliminar el exceso de bromuro. Posteriormente fue fotodocumentado en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

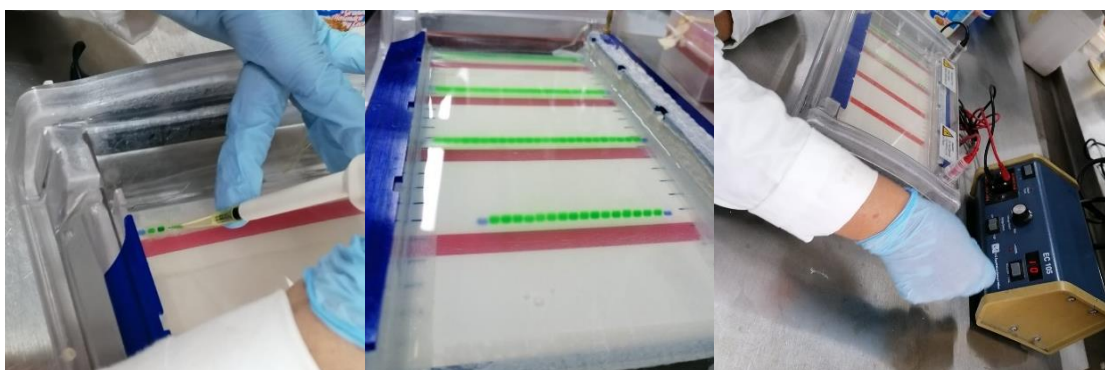


Figura 34. Carga de las reacciones de PCR en el gel y encendido de la fuente de poder a 90 volts.



Figura 35. Colocación del gel en el transiluminador.

ANEXO 3. PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD

Siembra de materiales y obtención de follaje

Para estas pruebas se utilizaron folíolos de 11 especies silvestres de *Solanum* (*S. acaule*, *S. albicans*, *S. berthaultii*, *S. brevicaule*, *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. guerreroense*, *S. juzepczuckii*, *S. microdontum*, *S. pinnatisectum*, *S. stoloniferum*). Dichas especies fueron sembradas el 11 de diciembre de 2021 y trasplantadas el cinco de febrero de 2022 en los invernaderos pertenecientes al departamento de Fitotecnia que se encuentran dentro del campus principal.

Durante el desarrollo de la planta se hicieron únicamente aplicaciones de Muralla Max (BETACYFLUTRIN 8.40% + IMIDACLOPRID 19.60%) para control de algunos áfidos. Se hicieron dos fertilizaciones granuladas (Triple 17) con un mes de diferencia entre ambas, siendo la primera a los 15 días de haber trasplantado.

Activación de los aislamientos

De los ocho aislamientos obtenidos inicialmente, solo se pudo trabajar y activar correctamente a seis de ellos, siendo aquellos que se aislaron de las especies *S. tuberosum*, *S. acaule*, *S. albicans*, *S. vernei*, *S. microdontum* y *S. juzepczuckii*.

Para su activación, dado que estuvieron guardados en tubos de ensaye con aceite mineral, se procedió a extraer el micelio desarrollado y sembrado en cajas Petri con medio PDA. Este procedimiento se realizó hasta que se desarrollaron correctamente en el medio.

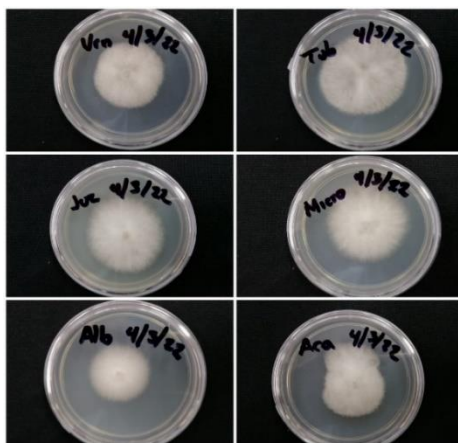


Figura 36. Desarrollo de los aislamientos hechos de 6 especies silvestres.

Recolecta del material vegetal

Se recolectaron foliolos de cada especie con el fin de llevar a cabo la inoculación. Se utilizaron en total 30 foliolos por especie, considerando que se realizaron seis cámaras húmedas correspondientes a los seis aislamientos a inocular. De los 30 foliolos colectados, se usaron cinco por cámara húmeda. Los foliolos fueron recolectados por la mañana, se depositaron en bolsas ziploc y guardados en una hielera para ser transferidos al laboratorio de micología agrícola en el departamento de Parasitología Agrícola.



Figura 37. Foliolos de distintas especies de *Solanum*.

Inoculación

Una vez desarrollado el micelio en su totalidad dentro de las cajas, se procedió a ajustar la concentración de propágulos a inocular. Primeramente, se licuo en 100 ml de agua destilada todo el micelio desarrollado en una caja Petri, la solución obtenida se depositó en un matraz, y se tomó una gota con una jeringa para insulina, para posteriormente depositarla en un hematocitómetro y realizar el conteo de propágulos/ml.

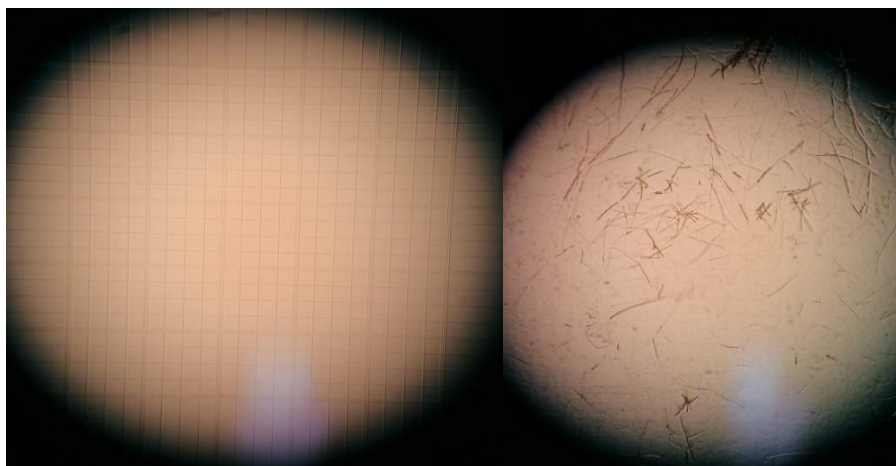


Figura 38. Vista en el microscopio del hematocitómetro y su posterior conteo de propágulos.

De acuerdo con Barquero *et al.*, 2005, el número de propágulos ideal para realizar una inoculación debe ser de 40,000/ml. Para los seis aislamientos se realizó el paso anterior, y se ajustó el volumen de acuerdo con los valores obtenidos con la formula $C_i V_i = C_f V_f$ donde:

C_i : Concentración inicial

V_i : Volumen inicial

C_f : Concentración final

V_f : Volumen final

Inicialmente se obtuvieron los siguientes valores contados en el hematocitómetro usando la formula $A+B+C+D+E$ (cuadrantes del hematocitómetro) y multiplicarlo por 2000 para obtener la cantidad de propágulos por mililitro, como se muestran en el cuadro siguiente:

Cuadro 17. Numero de propágulos/ml contados inicialmente por aislamiento.

Aislamiento	Cantidad inicial de propágulos/ml
Juz	536,000
Micro	98,000
Vrn	126,000
Aca	92,000
Tub	136,000
Alb	88,000

Obtenidas las soluciones ajustadas a la cantidad deseada (40,000 propágulos/ml), se procedió a realizar la inoculación. De acuerdo con Sharma *et al.*, 2010, aplicar una gota de 20 μ L de cerca de la nervadura central es suficiente para inocular exitosamente, por lo cual se realizó del mismo modo.

Se prepararon seis cámaras húmedas, cada una de ellas contenía una malla plástica para servir de sostén a 11 contenedores de papel aluminio donde se colocarían cinco folíolos por especie acorde a las 11 especies de *Solanum* a inocular.



Figura 39. Preparación de cámaras húmedas

Una vez listas las cámaras, se procedió al acomodo de los folíolos de las 11 especies de *Solanum* en un DCA. Cada folíolo fue lavado en agua destilada y se pasó por cloro comercial al 2% con el objetivo de garantizar mayor efectividad en la inoculación. Colocadas las hojas en las cámaras, con el uso de una micropipeta, se colocó una gota de 20 μ L en el envés de la hoja, cerca de la nervadura central. Dado que se tenían cinco hojas por especie, se colocó una gota en cuatro de ellas, dejando una como testigo.

Al terminar la inoculación, se agregó agua destilada al fonde de las cámaras húmedas, teniendo cuidado de no mojar ningún folíolo, con la finalidad de incrementar la humedad relativa y favorecer el desarrollo del inoculo.



Figura 40. Inoculación de los folíolos con una gota de 20 μ L.

Una vez realizada la inoculación, se guardaron las cámaras húmedas colocando papel periódico con la finalidad de garantizar obscuridad y favorecer el desarrollo del inoculo. Las evaluaciones se iniciaron a las 72 horas de haber realizado la inoculación, evaluado incidencia y severidad.

A las 72 horas (tres días) se comenzaron las evaluaciones en cada cámara húmeda, y por especie, haciendo uso de un microscopio estereoscópico registrando los valores de severidad de acuerdo con la escala utilizada para folíolos desprendidos por Barquero *et al.*, 2005, registrando en Excel los datos, para posteriormente generar una curva de desarrollo por inóculo en las 11 especies distintas, teniendo en total seis curvas. Finalmente se realizó un análisis de varianza y comparación de medias en Minitab Statistical Software, Minitab® 21.1.1 (64-bit).

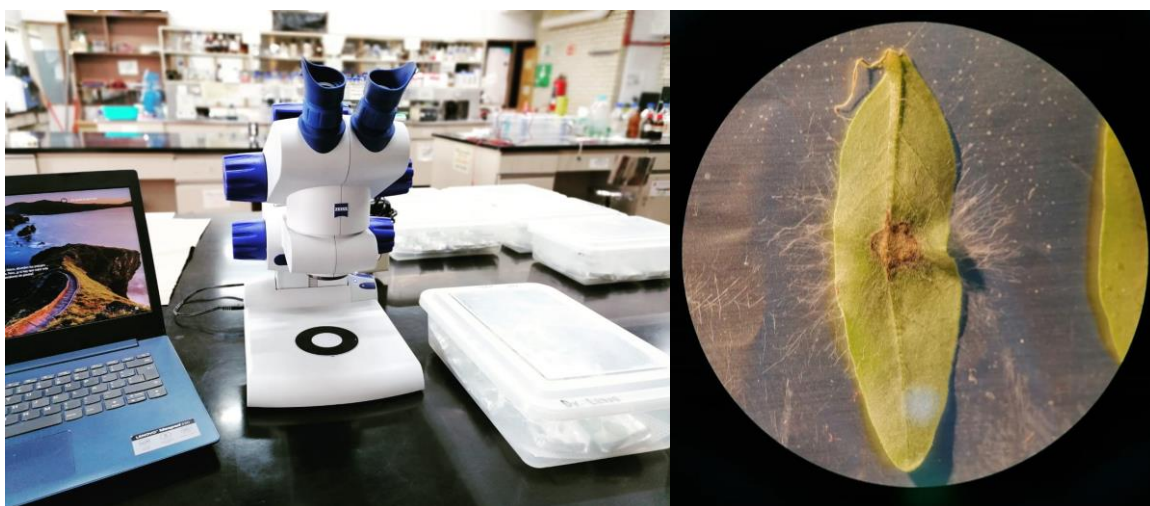


Figura 41. Evaluación de la severidad



Figura 42. Avance de la enfermedad y el desarrollo del micelio.

LITERATURA CONSULTADA

- Barquero, M., Gómez, L., & Brenes, A. (2005). Resistencia al tizón tardío (*Phytophthora infestans*) en materiales promisorios de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 29: 31-45 Consultado en <http://www.revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/download/6779/6466>
- Fernández, P., S., P., Díaz, C., M., Rodríguez, A., G., Gómez, D., N., Gloria, A., Z., Félix, G., R., Ochoa, A., S., Garay, S., E., Mondragón, F., A., Soto, P., A., Grünwald, N., J., Santillán, M., R. (2020) Manual de laboratorio de *Phytophthora*. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 84 pp.
- Soto Plancarte, A., Rodríguez Alvarado, G., Fernández Pavía, Y. L., Pedraza Santos, M. E., López Pérez, L., Díaz Celaya, M., & Fernández Pavía, S. P. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(8), 1867-1880. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications*. CRC press. 447 pp.