

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

**CARACTERIZACIÓN DE *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary Y
EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES DE RESISTENCIA EN
VARIEDADES DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCION VEGETAL**

PRESENTA

LEONEL GUZMÁN GALINDO

CHAPINGO, MEX.

DICIEMBRE DEL 2002

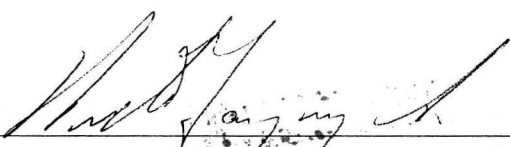


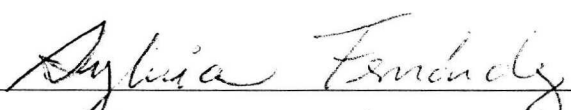
Bib.

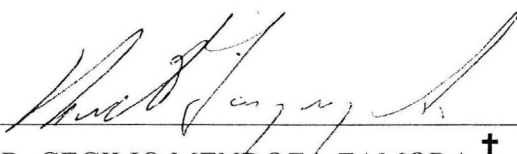
**CARACTERIZACION DE *Phytophthora infestans* (Mont.) DE BARY Y
EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES DE RESISTENCIA EN VARIEDADES
DE PAPA (*Solanum tuberosum* L.)**

Tesis realizada por **Leonel Guzmán Galindo** bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado
de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR: 
DR. HECTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR: 
DRA. SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVÍA

ASESOR: 
DR. CECILIO MENDOZA ZAMORA †

A.40391

DEDICATORIA

A MIS QUERIDOS PADRES:

Ramón Guzmán Lopez y María del Rosario Galindo Vazquez

Y

A MIS ADORABLES HERMANOS:

**Ramón, J. Lorenzo, Yesenia, Oscar, Beatriz, J. Feliciano, Chabelo, Linda, Chayito y
Elias**

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el financiamiento para la realización de la Maestría en Protección Vegetal.

A todos los profesores que integran el Programa en Protección Vegetal por la transmisión de sus conocimientos.

Al PICTIPAPA por el apoyo recibido para realizar la tesis.

Al Dr. Hector Lozoya Saldaña por la excelente dirección de la tesis y enseñanza en la investigación.

A la Dra. Sylvia Fernández Pavía por su ayuda, sencillez y las correcciones realizadas en el presente trabajo.

Al Dr. Cecilio Mendoza Zamora por la contribución en la mejoría del presente escrito y su amistad.

Al M.C. Francisco Ponce Gonzalez por su amistad y el apoyo recibido durante toda mi estancia en la Maestría.

A Gladys, Rosi y Gustavo por todos los ratos tan divertidos que tuvimos en este tiempo.

A Angel por ser un gran amigo.

A Edith, Claudia, Lupita, Saúl, Doña Chabe, Anita y Césareo por su amistad y ayuda en mi estancia en Metepec y a todos mis compañeros de generación de maestría por las gratas experiencias.

DATOS BIOGRAFICOS

Leonel Guzmán Galindo nació el 7 de septiembre de 1977, en un pequeño pueblo llamado Tepuzhuacán, Mpio. de Amatlán de Cañas, Nayarit, donde cursó la primaria “Amado Nervo” y la secundaria “Netzahualcoyotl”. Ingresó a la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo en 1992 donde terminó en 1995 ingresando al Departamento de Parasitología Agrícola de esta Universidad en el mismo año y obtuvo el título en 1999. En el año 2000 ingresó al Programa en Protección Vegetal donde terminó sus créditos escolares en diciembre del 2001. A partir de mayo del 2002 labora en la empresa FMC Agroquímica de México en el área de Investigación y Desarrollo.

CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Tizón tardío de la papa.....	4
2.2. Tipo de compatibilidad.....	5
2.3. Análisis de isoenzimas.....	6
2.4. Análisis genético.....	8
2.5. Sensibilidad a metalaxil.....	8
2.6. Resistencia al tizón tardío.....	9
2.7. Componentes de resistencia.....	11
III. MATERIALES Y METODOS.....	15
3.1. Determinación del tipo de compatibilidad.....	15
3.2. Análisis de isoenzimas.....	16
3.3. Agrupamiento genético.....	19
3.4. Sensibilidad a metalaxil.....	19
3.5. Componentes de resistencia.....	20
3.6. Evaluación de los componentes de resistencia.....	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
4.1. Tipo de compatibilidad (TC) y perfiles isoenzimáticos.....	24
4.1.1. Aislamientos obtenidos de la variedad Alpha.....	24
4.1.2. Aislamientos obtenidos de la variedad Norteña.....	25
4.1.3. Aislamientos obtenidos de la variedad Rosita.....	25
4.1.4. Aislamientos obtenidos de la variedad Monserrat.....	26

4.1.5. Aislamientos obtenidos de la variedad Michoacán.....	27
4.2. Agrupamiento genético.....	28
4.3. Resistencia a metalaxil por variedades.....	29
4.3.1. Variedad Alpha.....	29
4.3.2. Variedad Norteña.....	30
4.3.3. Variedad Rosita.....	31
4.3.4. Variedad Monserrat.....	32
4.3.5. Variedad Michoacán.....	33
4.4. Resistencia a metalaxil por concentración.....	34
4.4.1. Concentración de 1 µg/ml de metalaxil.....	34
4.4.2. Concentración de 10 µg/ml de metalaxil.....	36
4.4.3. Concentración de 100 µg/ml de metalaxil.....	38
4.5. Resistencia a metalaxil por rangos de crecimiento relativo.....	40
4.6. Componentes de resistencia en condiciones de laboratorio.....	42
4.6.1. Por aislamientos.....	42
4.6.2. Por variedad.....	44
4.6.3. Por variedades, independientemente del aislamiento.....	45
4.6.4. Combinación aislamiento-variedad.....	46
4.7. Componentes de resistencia en condiciones de invernadero.....	49
4.7.1. Por aislamientos.....	49
4.7.2. Por variedad.....	50
4.7.3. Por variedades, independientemente del aislamiento.....	51
4.7.4. Combinación aislamiento-variedad.....	52
V. CONCLUSIONES.....	55
VI. LITERATURA CITADA.....	56
VII. APÉNDICE.....	63

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Alpha.....	24
Cuadro 2. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Norteña.....	25
Cuadro 3. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Rosita.....	26
Cuadro 4. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Monserrat.....	27
Cuadro 5. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Michoacán.....	27
Cuadro 6. Periodo latente, porcentaje de área dañada y esporulación de aislamientos procedentes de Alpha, Rosita y Norteña bajo condiciones de laboratorio.....	43
Cuadro 7. Periodo latente, porcentaje de área dañada y esporulación entre las variedades Alpha, Rosita y Norteña bajo condiciones de laboratorio.....	45
Cuadro 8. Periodo latente, porcentaje de área dañada y esporulación en las variedades Alpha, Rosita y Norteña bajo condiciones de laboratorio.....	46
Cuadro 9. Periodo latente, porcentaje de área dañada y esporulación en la combinación aislamiento-variedad, de Alpha, Rosita y Norteña, bajo condiciones de laboratorio.....	47
Cuadro 10. Porcentaje de área dañada y esporulación de los aislamientos procedentes de Alpha, Norteña y Rosita, bajo condiciones de invernadero.....	49
Cuadro 11. Porcentaje de área dañada y esporulación entre las variedades Alpha, Rosita y Norteña, bajo condiciones de invernadero.....	50
Cuadro 12. Porcentaje de área dañada y esporulación en las variedades Alpha, Norteña y Rosita, sin tomar en cuenta el aislamiento, bajo invernadero.....	51
Cuadro 13. Porcentaje de área dañada y esporulación en la combinación aislamiento-variedad en Alpha, Rosita y Norteña, bajo condiciones de invernadero.....	52

LISTA DE FIGURAS

Pag.

Figura 1. Dendrograma de los genotipos de aislamientos procedentes de las variedades Alpha, Norteña, Rosita, Monserrat y Michoacán.....	29
Figura 2. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Alpha.....	30
Figura 3. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Norteña.....	31
Figura 4. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Rosita.....	32
Figura 5. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Monserrat.....	33
Figura 6. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Michoacán.....	34
Figuras 7. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 1 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa.....	35
Figura 8. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 1 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedadesde papa.....	36
Figuras 9. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 10 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa.....	37
Figura 10. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 10 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa..	38

Figuras 11. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 100 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa.....	39
Figura. 12. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 100 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa.....	40
Figura 13. Distribución de porcentajes de siembra en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con metalaxil a 1, 10 y 100 µg/ml procedentes de cinco variedades de papa.....	41
Figura. 14. Periodo latente de los aislamientos sobre las variedades de donde se obtuvieron, bajo condiciones de laboratorio.....	47
Figura. 15. Porcentaje de área dañada (A) y esporulación de los aislamientos (B) sobre las variedades de donde se obtuvieron, bajo condiciones de laboratorio.....	48
Figura. 16. Porcentaje de área dañada (A), y esporulación (B) de los aislamientos sobre las variedades de donde se obtuvieron, bajo condiciones de invernadero.....	53

RESUMEN

A fin de caracterizar e identificar la posible relación de las cepas de *P. infestans* con el hospedante de origen, a aislamientos obtenidos de las variedades de papa Alpha, Rosita, Norteña, Monserrat y Michoacán se les determinó su tipo de compatibilidad, el genotipo para las isoenzimas *Glucosa-6-fosfato isomerasa (Gpi)* y *Peptidasa (Pep)* y la sensibilidad al metalaxil. En laboratorio e invernadero se evaluó el período latente, el área de la lesión y la capacidad de esporulación sobre Alpha, Norteña y Rosita con aislamientos obtenidos de ellas mismas. No se observó predominancia de alguno de los tipos de compatibilidad en relación con el grado de resistencia genética de los hospedantes (A1:A2, respectivamente, Alpha, susceptible, 1:1.5; Rosita, intermedia, 1.5:1; Norteña, resistente, 1:1; Monserrat, resistente, 1:2; y Michoacán, resistente, 5:1). Los genotipos multilocus mas comunes (tipo de compatibilidad e isoenzimas *Gpi* y *Pep*) fueron el A1, 86/100, 100/100 (37 % del total) para los aislamientos de Alpha, Rosita, Norteña y Michoacán y el A2, 86/100, 100/100 (8 % del total) para los de Monserrat. Todos los genotipos encontrados en este estudio han sido previamente reportados. De igual manera, el grado de sensibilidad al metalaxil no varió con respecto a reportes anteriores. En laboratorio los mayores porcentajes de área dañada los mostró la variedad Rosita con aislamientos de ella misma y de Alpha (91.7 y 86.9%, respectivamente), seguida por Alpha con aislamiento de Rosita (74.6 %), aunque sin diferencias estadísticas entre ellos. La cepa de Alpha presentó el mayor número de esporangios/ml inoculada en ella misma (168,170) y en Rosita (101,000). En invernadero el área mas dañada se obtuvo en los hospedantes Norteña y Alpha con el inóculo de Rosita, seguida por las tres variedades inoculadas con el aislamiento de Norteña, sin diferencia estadística en este subgrupo (39.3-31.5 %). Además los aislamientos de Rosita inoculados en plantas de Alpha también indujeron la mayor esporulación (151,500 esporangios/ml) seguidos por el aislamiento de Alpha inoculado en ella misma (110,830). La agresividad de los aislamientos sobre todas las variedades mostró la falta de especificidad hospedero/patógeno.

PALABRAS CLAVE: Compatibilidad, isoenzimas, metalaxil, resistencia.

SUMMARY

In order to characterize and identify the possible relationship of *P. infestans* strains with the host they were obtained from, compatibility type, isozyme genotype for *Glucose-6-phosphate isomerase*(*Gpi*) and *Peptidase* (*Pep*) and sensitivity to metalaxyl were assessed in isolates obtained from the potato varieties Alpha, Rosita, Norteña, Monserrat and Michoacán. Also, lesion area and sporulation capacity under laboratory and greenhouse conditions in the varieties Alpha, Norteña and Rosita with isolates from themselves were evaluated. No predominance of any mating type related to host genetic resistance was observed (A1:A2, respectively, Alpha, susceptible, 1:1.5; Rosita, intermediate, 1.5:1; Norteña, resistant, 1:1; Monserrat, resistant, 1:2; Michoacán, resistant, 5:1). The most common multilocus genotypes (mating type, *Gpi* and *Pep*) were A1, 86/100, 100/100 for the isolates obtained from Alpha, Rosita, Norteña, and Michoacán, and A2, 86/100, 100/100 for the isolates from Monserrat. All the genotypes found in this study have been previously reported. Similarly, the level of metalaxyl sensitivity was not different with respect to previous reports. Under laboratory conditions the most damaged area was observed in the variety Rosita when inoculated with its own and Alpha's isolate (91.7 and 86.9 % respectively), followed by the host Alpha with Rosita's isolate (74.6 %) with no statistical difference among them. The isolate from Alpha produced the most sporangia/ml when inoculated in the same variety (168,170) and in Rosita (101,000). In the greenhouse the most damaged area was obtained in Norteña and Alpha with Rosita's inoculum, followed by the three varieties when inoculated with the isolate from Norteña, without statistical difference within this subgroup (from 39.3 to 31.5 %). In addition, isolates from Rosita inoculated in plants of Alpha also resulted in the highest sporulation (151,500 sporangia/ml) followed by the isolate from Alpha inoculated in the same variety (110,830). The aggressiveness of the isolates showed the lack of host/pathogen specificity over all varieties.

KEY WORDS: Compatibility, isozymes, metalaxyl, resistance.

I. INTRODUCCION

El tizón tardío de la papa causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, es la enfermedad más importante de este cultivo a nivel mundial (Gebhardt y Valkonen, 2001). Este oomiceto es heterotálico, es decir se necesitan dos tipos de compatibilidad para que pueda existir la recombinación sexual (Fry *et al.*, 1992). La reproducción sexual y la presencia de oosporas viables ha dado como resultado una gran variabilidad del patógeno tanto genética como patogenicamente, provocando una adaptación más rápida a fungicidas y a hospedantes con resistencia (Flier, 2001).

Las investigaciones se han enfocado en el mejoramiento del cultivo incrementando la resistencia al tizón tardío, introduciendo genes de resistencia durable que soporten la presión del patógeno (Inglis *et al.*, 1996; Flier *et al.*, 1991). Este tipo de resistencia permite la reducción en el uso de fungicidas, sin efectos adversos sobre la salud y el ambiente, manteniendo una buena producción y estándares de calidad (Inglis *et al.*, 1996).

Una de las fuentes de resistencia de mayor importancia es la especie silvestre de papa *Solanum demissum* que tiene genes mayores (R) de resistencia a *P. infestans*. Esta resistencia se han transferido a la papa cultivada, aunque en muchas de las variedades obtenidas de estas cruas ya se ha perdido (Colon *et al.*, 1995). Se debe contar con información adecuada sobre el nivel de resistencia al patógeno, para predecir la durabilidad de la resistencia (Latin *et al.*, 1981).

La resistencia se puede medir como la capacidad de un genotipo del hospedante para sobrevivir, crecer y reproducirse y se manifiesta cuando una o más etapas en el ciclo de vida del patógeno es disminuida o bloqueada completamente. En este tipo de estudio, cada factor del hospedante que afecte una fase específica en el ciclo de vida del patógeno se llama componente de resistencia (Tooley *et al.*, 1986; Colon *et al.*, 1995). Aunque los métodos que se utilizan para estimar los diferentes componentes de resistencia y las definiciones exactas de estos, pueden variar entre autores (Umaerus *et al.*, 1995).

De los componentes de resistencia que se han medido en especies de *Solanum* silvestres, así como en variedades con diferente grado de resistencia o susceptibilidad al *P. infestans* son: eficiencia de infección, tasa de crecimiento de la lesión, capacidad y período de esporulación, período de infección, probabilidad de infección y período latente. Estos componentes varían entre especies y dentro de las especies (Colon *et al.*, 1995; Cañizares y Forbes, 1995; Guzmán-N, 1964).

Los estudios que se han hecho de los componentes de resistencia a *P. infestans* pueden ser difíciles de interpretar (Umaerus *et al.*, 1995). También se necesitan estudios adicionales para extender nuestro conocimiento en la interacción hospedante-patógeno en el patosistema papa-*P. infestans* en la resistencia (Flier, 2001).

El análisis de isoenzimas, el nivel de sensibilidad a metalaxil y la determinación del tipo de compatibilidad, son aspectos de importancia que se han estudiado para estimar la diversidad genética en las poblaciones y poder analizar su comportamiento en

los campos de cultivo. Así mismo, al comparar los resultados de diversos autores se puede detectar la posible evolución del patógeno.

Con base a los aspectos anteriores, se planteó la presente investigación con los objetivos siguientes:

1. Caracterizar cultivos de *P. infestans* con base en sus perfiles isoenzimáticos, resistencia a metalaxil y tipo de compatibilidad, aislados de variedades con diverso grado de resistencia genética al oomyceto, así como identificar relaciones potenciales de las cepas con el hospedante de origen y detectar posibles cambios en relación con estudios previos.
2. Evaluar los componentes de resistencia de tres variedades (Rosita, Norteña y Alpha) bajo condiciones de invernadero y laboratorio.
3. Establecer la posible relación entre aislamiento-variedad en cuanto a los componentes de resistencia.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Tizón tardío de la papa

Phytophthora infestans (Mont.) De Bary es el agente causal del tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum*) y de otras plantas de la familia *Solanaceae* (Dagget *et al.*, 1993). Es la enfermedad de la papa más importante a nivel mundial y causante de la hambruna mas devastadora en Europa en la década de los 1840's afectando a millones de personas (Gebhardt y Valkonen, 2001).

Este oomyceto presenta una gran variabilidad genética. La variabilidad en su patogenicidad se registró por primera vez en 1919, cuando los aislamientos de papa fueron patogénicos únicamente a papa, en tanto que los de tomate fueron más patogénicos a papa que a tomate (Giddings y Berg, 1919). Este tipo de estudios se continúan haciendo a la fecha en diversas regiones (Erselius *et al.*, 2000; Grünwald *et al.*, 2001; Goodwin *et al.*, 1992; Tooley *et al.*, 1985).

P. infestans es heterotálico, se necesitan dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) para que pueda existir recombinación sexual. El tipo de compatibilidad A1 se conocía hasta la primera mitad del siglo XX; tiempo después el otro tipo de compatibilidad, A2, se descubrió en el Valle de Toluca, que es considerado el centro de origen de este organismo (Fry *et al.*, 1992).

La reproducción sexual y la consecuente presencia de oosporas funcionales ha dado como resultado gran variación del patógeno que puede llevar a una tolerancia más rápida a fungicidas sistémicos y a atacar a hospedantes con resistencia (Flier, 2001).

El éxito o fracaso en el mejoramiento genético para obtener resistencia a patógenos depende de gran manera en la capacidad de variación de la población del patógeno (Umaerus *et al.*, 1995).

En México se encuentran los dos tipos de compatibilidad y la recombinación sexual puede presentarse de manera natural con gran frecuencia, lo que trae como resultado que se originen aislamientos patogenicamente más variables o con mayor adaptación que aquellos que se reproducen estrictamente de manera asexual (Tooley *et al.*, 1986; Grünwald *et al.*, 2001).

2.2. Tipo de compatibilidad

Gallegly y Galindo (1958) mencionan que la recombinación sexual en *P. infestans* se basa en la coexistencia de dos tipos de compatibilidad, el A1 y A2 y que el A1 es cosmopolita, mientras que el A2 solo se había encontrado en México. Se identificaron los primeros aislamientos con el tipo de compatibilidad A2 fuera de México a comienzos de la década de los '80 en Alemania y Suiza, y posteriormente se ha reportado en muchos países de Europa, Asia, América y África (Fry *et al.*, 1993).

En los primeros estudios del altiplano mexicano se reportó que el 45 % se comportó como A2 y el 55% como A1, dando una proporción aproximada de 1:1 (Gallegly y Galindo, 1958). Esta misma proporción se ha reportado posteriormente (Grunwald *et al.*, 2001 y Goodwin *et al.*, 1992). Debido a esta relación en el tipo de compatibilidad, la reproducción sexual se da con mucha frecuencia dando como resultado una gran diversidad genética de *P. infestans* en México, especialmente en el Valle de Toluca (Fry *et al.*, 1993).

2.3. Análisis de isoenzimas

Las isoenzimas son formas diferentes de una sola enzima. Típicamente cada enzima posee la misma habilidad catalítica, con un cambio pequeño en la composición permiten distinguir las diferentes formas de una misma enzima. Estos cambios resultan por la substitución de un solo aminoácido en el todo de la enzima proteínica. Estos cambios pueden detectarse midiendo la carga enzimática por electroforesis (Goodwin *et al.*, 1995). Son específicas de tejido, estado de desarrollo y especie. Las isoenzimas se comportan como genes codominantes con pocos efectos epistáticos y poco influidos por el medio ambiente (Flores *et al.*, 1997).

El análisis de isoenzimas es un marcador neutral para identificar niveles de variación genética en una población, con la ventaja de que la expresión de los alelos no depende del ambiente (Tooley *et al.*, 1985). Para realizar el análisis de isoenzimas se necesitan materiales que permitan su movilidad con la ayuda de cargas eléctricas. Estos

materiales pueden ser el gel de almidón, gel de agar, gel de acrilamida y placas de acetato de celulosa (Hebert y Beaton, 1989).

La electroforesis en placas de acetato de celulosa dan una excelente resolución para los genotipos de isoenzimas de *P. infestans* para dos locus de la *Glucosa-6-fosfato isomerasa* (*Gpi*) y *Peptidasa* (*Pep*). Esta técnica tiene ventajas sobre otras, porque es rápida ya que se corre en 15 a 20 min y se compran las placas listas para utilizarse. Ambas enzimas se pueden analizar usando un solo amortiguador en este sistema de electroforesis. Otra ventaja es que se necesita poca cantidad de muestra de tejido (Goodwin *et al.*, 1995).

Mediante el análisis de isoenzimas se ha encontrado una amplia diversidad genética en *P. infestans* en México. En el Noroeste solo se detectaron cuatro genotipos de los cuales dos son muy comunes. En el Centro, la mayoría de los aislamientos presentaron un genotipo único. En el Noreste hubo un gran número de genotipos distintos, pero algunos fueron más frecuentes que otros (Goodwin *et al.*, 1992). De los encontrados en el centro del país, la mayoría también se han encontrado en otros países (Fry *et al.*, 1992). Esto se ha cotejado años después al encontrar una gran diversidad genética en 1997-1999 con muchos genotipos que se encuentran en baja prevalencia. De 179 aislamientos obtenidos en el primer período, se encontraron 32 genotipos diferentes y en el segundo período de 389 aislamientos se encontraron 50 genotipos diferentes. También hubo genotipos únicos en cada colección. El genotipo más común (basado en el tipo de compatibilidad y genotipo de *Gpi* y *Pep*) fue diferente en los dos períodos de muestreo, siendo el genotipo “A2, 100/100, 100/100” el más común en el período 1997-

98 y el “A2, 86/100, 100/100” en 1988-89. Para *Gpi* los alelos encontrados fueron 83, 86, 100, 111, 122 y 130 y para *Pep* los alelos 78, 92, 96 y 100 (Grunwald *et al.*, 2001).

2.4. Análisis genético

Para analizar las poblaciones de *P. infestans* se han utilizado marcadores isoenzimáticos que han determinado la diversidad y distancia genética entre aislamientos. Son marcadores neutrales porque no están relacionados con alguna característica biológicamente importante o alterable por el medio ambiente (Drenth y Govers, 1994). Existen diversos programas para analizar el patrón de bandas que resultan de una electroforesis de isoenzimas para agrupar las poblaciones en base a sus características genotípicas, proporcionando una escala de identidad o similitud entre ellas (distancia genética). UPGMA (Unweighted Pair-Group Arithmetic Average Method, por sus siglas en inglés) es un procedimiento que provee una representación gráfica de la distancia genética de los datos, lo que permite hacer inferencias de las posibles relaciones entre las poblaciones de estudio (Miller, 1997). En este caso la mayor proximidad genética el valor es cercano a cero.

2.5. Sensibilidad a metalaxil

La sensibilidad de *P. infestans* a metalaxil se puede medir por medio de discos foliares, con hojas desprendidas, en plantas completas de papa y en cajas petri midiendo el crecimiento radial del micelio en medio de centeno-agar con metalaxil a diferentes concentraciones (Sozzi y Staub, 1987).

En Holanda en 1980, se encontraron los primeros aislamientos resistentes de *P. infestans* a metalaxil en campos comerciales de papa (Davidse *et al.*, 1981).

En aislamientos de los estados de Chiapas, Coahuila, México, Michoacán, Puebla, Veracruz y Sinaloa, los que resultaron sensibles a metalaxil predominaron en los estados de Chiapas y Michoacán. En tanto los del Edo. de México (Valle de Toluca) se encontró la mayor variación en sensibilidad (Matuszak *et al.*, 1994). La proporción de aislamientos sensibles en este lugar fue mayor que la encontrada en Chapingo (Deahl *et al.*, 1995). Asimismo, los aislamientos obtenidos en tres habitats diferentes en el área de Toluca resultaron en su mayoría sensibles al fungicida (Grünwald *et al.*, 2001).

La sensibilidad de los aislamientos con diversidad genética se distribuyó uniformemente, encontrándose la media de la EC50 (Concentración efectiva 50) en 52.5 ppm, el 44 % de los aislamientos tuvieron un valor de la EC50 mayor a 100 ppm (Sujkowski *et al.*, 1995).

2.6. Resistencia al tizón tardío

Al comienzo del siglo XX, poco después del redescubrimiento de las leyes de la herencia de Mendel, se descubrió que especies de *Solanum* silvestres podían ser fuentes de resistencia genética a *P. infestans*. Basados en este descubrimiento, la introducción de genes de resistencia se inició cruzando papas silvestres, con resistencia, con variedades de papa comerciales con susceptibilidad al patógeno (Gebhardt y Valkonen, 2001), no obstante, los numerosos intentos para lograr la resistencia durable en papa por

medio de la incorporación de genes mayores (R) de *S. demissum* y *S. stoloniferum* no han tenido éxito debido a la rápida adaptación del patógeno (Flier, 2001). A la fecha, la mayoría de variedades de papa que se cultivan en Europa Occidental y Norte América son susceptibles a *P. infestans* (Colon *et al.*, 1995).

Se ha incrementado la demanda de otros métodos de control o protección del cultivo sin efectos adversos sobre la salud y el ambiente y la mayoría de los programas de mejoramiento en papa se han enfocado en el mejoramiento por medio de resistencia durable contra *P. infestans* (Inglis *et al.*, 1996).

La resistencia varía de una resistencia parcial con un nivel bajo, como sucede con algunas variedades de papa, a inmune como en especies silvestres. Genes R de resistencia a *P. infestans* de la especie mexicana *S. demissum* se han transferido a papa, pero a muchas de las variedades las ha superado el patógeno y su uso no es recomendado por mucho tiempo. La resistencia parcial de *Solanum tuberosum*, que se presume es poligénica y parece ser durable puede ayudar a proteger al cultivo de papa de *P. infestans*, causante del tizón tardío (Wastie, 1991)

En años recientes se han reportado brotes severos de tizón tardío en variedades con altos niveles de resistencia parcial y con una alta incidencia de tubérculos con tizón provocando serias pérdidas en la producción (Kadish y Cohen, 1992).

La información adecuada sobre el nivel de resistencia al patógeno es muy importante para los agricultores que practican un manejo integrado del cultivo. La

presencia de una población variable en agresividad del patógeno puede afectar la durabilidad de la resistencia parcial debido a la acelerada adaptación de formas agresivas del patógeno con niveles mas altos de adaptación parasítica (Latin *et al.*, 1981).

La resistencia generalmente afecta la reproducción del patógeno más que su dispersión. Se puede medir la incidencia de la enfermedad, su severidad se puede evaluar midiendo el número de infecciones exitosas expresadas como el número de lesiones, así como el tamaño y/o extensión de la lesión. La severidad finalmente es el resultado de a) la frecuencia de infección, que es la proporción de esporas que resultan en lesiones con esporulación, b) período latente medido como el tiempo que transcurre de la infección a la producción de esporas, c) la producción de esporas expresada con el número esporas producidas por lesión o por unidad de área de tejido afectado y/o por unidad de tiempo, y d) período de infección, que es el tiempo en el cual el tejido enfermo esporuló (Parlevliet, 1979).

2.7. Componentes de resistencia

Los componentes específicos de resistencia son aquellos que limitan los procesos de infección incluyen; a) la eficiencia de infección, que se mide por medio del número de lesiones que se desarrollan como consecuencia de una inoculación con una cantidad conocida de esporangios o zoosporas, que indica no solo la resistencia al primer contacto sino también involucra la resistencia a la colonización; b) el periodo latente, medido como el tiempo transcurrido entre la inoculación y la producción esporas; c) la producción de esporas o esporangios, expresada como el número de esporas producidas

por lesión o por unidad de área de tejido afectado y/o por unidad de tiempo; d) la colonia y tamaño de la lesión, el primer termino se refiere al área actual invadida por el patógeno y el segundo se refiere al área que muestra los síntomas de la enfermedad (Parlevliet, 1979; Colon *et al.*, 1995).

En la resistencia parcial, resistencia de genes menores, tolerancia o resistencia de campo, las plantas pueden ser infectadas, pero los daños pueden ser ligeros o moderados y la dispersión del patógeno en el campo disminuye relativamente. La resistencia parcial comprende algunas reacciones de la planta a la enfermedad que se pueden medir individualmente. Estas pueden ser el retraso en la penetración, una penetración menor al tejido, menor proporción de invasión del tejido de la planta y poca esporulación del patógeno (Guzmán-N, 1964).

La importancia real de estos componentes en cultivares de papa parcialmente resistentes, revisada por Oijen (1992), no son claros y se han reportado resultados contradictorios. Sin embargo, el análisis de la tasa de crecimiento de la lesión y tiempo de generación de 15 cultivares en experimentos de campo parecen confirmar la gran importancia de la tasa de crecimiento de la lesión. En estudios realizados con *P. infestans* en 1992, dos componentes que presentaron los mayores efectos en el nivel de resistencia fueron la eficiencia de infección y la tasa de crecimiento de la lesión y los que tuvieron un efecto menor fueron la capacidad de esporulación y el período de esporulación (Colon *et al.*, 1995).

Se han reportado diferencias entre los componentes de resistencia entre las variedades de papa. Entre ellas están el periodo de incubación y el tamaño de lesión; en la frecuencia o eficiencia de infección y se han recomendado para su estudio la probabilidad de infección, la proporción en la cual los esporangios se forman y el número de esporangios que se forman por unidad de área foliar, que se ha demostrado varía ampliamente e independientemente de otros (Umaerus *et al.*, 1995).

Guzmán-N (1964) trabajando con clones de tres especies de *Solanum* con diferente grado de resistencia a *P. infestans*, encontró que aquellos con mas resistencia en campo produjeron pocos esporangios y zoosporas. También encontró que los clones susceptibles esporularon más rápido que los resistentes. Esto significa que el potencial de reproducción del patógeno en una población se incrementa en variedades susceptibles con respecto a las variedades resistentes. También el oomyceto invadió rápidamente las hojas de las variedades más susceptibles en campo. En cuanto al periodo de incubación aparentemente no hubo diferencia entre las variedades. Finalmente, los resultados mostraron que la tasa de penetración, invasión del tejido, tiempo requerido para la esporulación y abundancia de esporulación están asociadas con la resistencia a *P. infestans* en campo.

Los componentes específicos que contribuyen mas a reducir la diversidad de la enfermedad varían entre especies y dentro de las especies (Cañizares y Forbes, 1995). La eficiencia de infección, periodo latente y tasa de crecimiento de la lesión fueron importantes en *S. microdontum* mientras que la eficiencia de infección, tasa de

crecimiento de la lesión y capacidad de esporulación fueron importantes en *S. tuberosum* (Colon *et al.*, 1995).

Los componentes de resistencia no han sido bien estudiados en hospedantes de *Phytophthora*, y los pocos estudios hechos con *P. infestans* pueden ser difíciles de interpretar. Todos los aspectos del ciclo de vida deben ser evaluados para medir los efectos que tienen sobre la resistencia total (Umaerus *et al.*, 1995). Recientemente una investigación demostró claramente la especificidad en las interacciones aislamiento por variedad (Flier, 2001).

III. MATERIALES Y METODOS

Los aislamientos utilizados en este trabajo fueron obtenidos de las variedades Alpha (A, n=21), Rosita (R, n=21), Norteña (N, n=19), Monserrat (Mo, n=12) y Michoacán (Mi, n=23). Para obtener los aislamientos se tomaron de lesiones simples de plantas infectadas naturalmente en el campo experimental del Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa (PICTIPAPA) en el valle de Toluca, México durante el verano del año 2000. Los aislamientos se obtuvieron y mantuvieron de acuerdo a la metodología reportada por Grünwald *et al.*, 2001.

3.1. Determinación del tipo de compatibilidad

Para realizar esta prueba se siguió la metodología utilizada por Daayf *et al.* (2001) y Garay (2001) modificando la temperatura de incubación de los aislamientos. Para determinar el tipo de compatibilidad, se usaron como referencia aislamientos previamente caracterizados con el tipo de compatibilidad A1 y A2.

En una caja petri con medio de centeno agar (ver preparación en el apéndice) se colocó en uno de sus extremos un disco de agar (5 mm de diámetro) con micelio de un aislamiento con tipo de compatibilidad desconocido y en el otro extremo de la caja se colocó otro disco de agar con micelio del aislamiento con tipo de compatibilidad A1 y se repitió el mismo procedimiento con el A2. Se dejaron crecer a temperatura ambiente durante quince días y se examinaron al microscopio para determinar la presencia o ausencia de oosporas. Si el aislamiento formó oosporas con el tipo A1, entonces su tipo

de compatibilidad se clasificó como A2, y si produjo con el tipo A2, se le asignó el tipo de compatibilidad A1.

3.2. Análisis de isoenzimas

Se corrieron electroforesis en placas de acetato de celulosa donde se obtuvieron los perfiles para las enzimas *Peptidasa (Pep)* y *Glucosa-6-fosfato isomerasa (Gpi)* y se determinaron los genotipos con base a la técnica descrita por Goodwin *et al.* (1995) y Hebert y Beaton (1989):

1. Preparación del tejido.

- a) Se sembraron los aislamientos para obtener el micelio en quince días.
- b) Con una aguja de disección se tomó micelio por separado de cada uno de los aislamientos.
- c) Cada una de las muestras se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, que contenían 30 µl de agua destilada. Se maceró el tejido con un taladro común con brocas de plástico tipo pistilo con arena esterilizada.
- d) Se centrifugó durante 1 min a 14 000 rpm.

2. Preparación de amortiguador y placas.

En un tanque cúbico se colocaron las placas de acetato de celulosa (Titan III, Helena Laboratories) y se agregó el amortiguador Trisma-Glicina (Al 0.025 M para trisma y 0.192 M para glicina, con pH de 8.5) hasta que quedaron inmersas. Después de

20 minutos se sacaron del amortiguador y se colocaron en una base para aplicarles la muestra.

3. Electroforesis.

- a) Se sacó del tanque una placa de acetato de celulosa y se secó con papel filtro. La placa se colocó en la base de alineación.
- b) Se colocaron de 8-10 μ l de sobrenadante, en los pozos de la placa del peine aplicador.
- c) Con el aplicador se transfirió la muestra 3 veces para *Gpi* y 5 veces para *Pep* y se marcó en uno de los extremos de la placa con bromofenol azul para observar el recorrido
- d) En la cámara de electroforesis se colocaron las placas con las muestras hacia abajo sobre los rieles y el corrimiento fue del polo negativo al positivo.
- e) El corrimiento fue a 180-200 volts por 20 minutos para *Gpi* y 15 minutos para *Pep*.

4. Tinción.

Se mezclaron los reactivos correspondientes para cada enzima (*Gpi* y *Pep*), la mezcla se vació sobre la placa cubriéndola totalmente y se cubrió con un recipiente para impedir el paso de la luz hasta que las bandas se pudieron visualizar. Posteriormente, se removió la mezcla con agar y se dejó secar la placa o se metió al horno a 60 °C hasta que se secó.

Reactivos para la tinción de *Gpi*

1.5 ml	Tris HCl 0.05M pH 8.0
5 gotas	D-Fructosa-6-fosfato [20 mg/ml]
1 ml	2-Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD) [3 mg/ml]
5 gotas	3-[4,5-Dimetilthiazol-2-y1]-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT) [10 mg/ml]
5 gotas	Fenazina Metosulfato (PMS) [2 mg/ml]
10 µl	Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa [1 U/ml]
2 ml	Agar 1.6%

Reactivos para la tinción de *Pep*.

2 ml	Tris HCl 0.05M pH 8.0
10 gotas	Glicil leucina [15 mg/ml]
5 gotas	Peroxidasa [1000 U/ml]
8 gotas	O-Dianisidina [4 mg/ml]
2 gotas	MgCl ₂ [20 mg/ml]
5 gotas	L-amino ácido oxidasa [10 u/ml]
2 ml	Agar 1.6 %

Los genotipos de cada aislamiento para *Pep* y *Gpi* se determinaron de acuerdo a la cantidad e intensidad de las bandas. Los aislamientos homocigotos se caracterizaron

por la presencia de una banda y los heterocigotos de 3 ó 5 bandas como máximo. Para determinar los alelos obtenidos se usaron como referencias los genotipos de Estados Unidos US-1, US-6, US-7 y US-8.

3.3. Agrupamiento genético

Con los datos obtenidos de tipo de compatibilidad e isoenzimas se realizó un análisis de UPGMA, que se utilizó para la construcción de un dendrograma utilizando el método de distancia genética modificada de Roger e inferir relaciones entre las subpoblaciones. Donde el tipo de compatibilidad A1 se consideró heterocigoto y el A2 como homocigoto (Judelson, 1996).

3.4. Sensibilidad a metalaxil

La respuesta de crecimiento en cajas petri de cada aislamiento a metalaxil se realizó por comparación del crecimiento del micelio en medio de centeno agar con metalaxil, con el crecimiento de un testigo sin fungicida. Primeramente se preparó una solución madre de metalaxil con agua destilada estéril a una concentración de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en base al producto formulado Ridomil Gold 4E® (46.2 % de metalaxil), después se le adicionó la cantidad necesaria al medio de cultivo centeno agar estéril para obtener las concentraciones de 100, 10 y 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. En estos medios se colocó en el centro un disco de agar con crecimiento de la periferia del aislamiento de una edad de 10 a 15 días en el centro de cada una de las cajas, se incubaron a 15 °C por 10 días. Posteriormente se

tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del crecimiento y se le restó el tamaño del disco. Con el valor promedio de dos repeticiones de cada uno de los aislamientos se calculó el porcentaje de crecimiento con respecto al testigo.

3.5. Componentes de resistencia

Los tres aislamientos de mayor esporulación de cada una de las variedades Norteña, Rosita y Alpha se utilizaron para inocular folíolos desprendidos y folíolos de plantas completas. Los aislamientos de Monserrat y Michoacán fueron excluidos de esta parte del trabajo. Las variedades que se utilizaron para medir los componentes resistencia fueron Norteña que presenta alta resistencia al tizón en campo, Rosita (Sangema) que presenta una resistencia intermedia y Alpha que es completamente susceptible al patógeno (Gutierrez y Cadena, 1996).

Producción y preparación del inóculo. El inóculo se preparó de acuerdo a Mizubuti y Fry (1998) modificando la concentración de esporangios, el tamaño y número de gotas, la temperatura de incubación y se utilizó agua estéril en lugar de una solución salina. Se agregaron 2 ml de agua estéril en la caja de petri con el crecimiento de *P. infestans* de 15 días de los tres aislamientos seleccionados de cada variedad, se frotó suavemente con el dedo para desprender los esporangios. La suspensión de esporangios se colocó en un vaso de precipitado, se contó el número de esporangios con un hemacitometro y se ajustó la suspensión a 10,000 esporangios ml^{-1} . La suspensión se colocó en el refrigerador a 4 °C por 1.5 a 2 horas, para facilitar la liberación de zoosporas. Con la suspensión se inocularon cinco hojas de la misma variedad de la que

se hizo el aislamiento con dos gotas de 20 μ l. Las hojas se colocaron en la tapa de cajas petri (con la tapa hacia abajo) con agua agar al 0.8% como cámara húmeda para asegurar la producción de esporangios. Del área infectada se obtuvieron nuevamente los esporangios que se utilizaron para la inoculación de folíolos en los tratamientos (Mizubuti y Fry, 1998).

Inoculación. Seis folíolos desprendidos de las variedades Alpha, Nortaña y Rosita, se inocularon con cada una de las suspensiones de esporangios de los aislamientos seleccionados (10,000 esporangios/ml). Primeramente se desprendieron los folíolos de las plantas que tenían 6 a 8 semanas de sembradas y se colocaron con el envés hacia arriba en la tapa de cajas petri con agua agar (la parte que contenía el agar quedó en la parte superior), después se inocularon con 20 μ l de suspensión y se colocaron en una cámara de crecimiento a 18 °C con 14 horas luz y 10 de oscuridad las gotas se secaron con un papel absorbente a las 24 horas para evitar el crecimiento de otros organismos (Mizubuti y Fry, 1998 y Colon *et al.*, 1995).

En el invernadero se inocularon tres plantas de 6 a 8 semanas de siembra. Las inoculaciones se hicieron sobre los dos primeros folíolos (después del apical) de la tercer hoja joven completamente desarrollada, que se considera fisiológicamente la más activa. Las inoculaciones se realizaron colocando una gota de 20 μ l a una concentración de 10,000 esporangios/ml en el envés de cada folíolo. Las inoculaciones se realizaron por la tarde, con 20 μ l de 10,000 esporangios/ml en el envés de los folíolos. Las plantas que se encontraban en un bancal se cubrieron con plástico haciendo un túnel para mantener

humedad relativa alta (90-100%) mediante humidificadores funcionando permanentemente dentro del túnel (Colon *et al.*, 1995).

3.6. Evaluación de los componentes de resistencia

Período latente. Se consideró como el tiempo transcurrido entre la inoculación y la emergencia de los primeros esporangios. Para esto, los folíolos desprendidos se examinaron con microscopio estereoscópico a las 48, 60 y 72 horas después de inoculados, para observar la aparición de esporangios que se consideró el término del periodo latente (Colon *et al.*, 1995), estimándose la media para cada aislamiento en cada variedad.

Área de la lesión. Se midió dos días después de que los esporangios fueron visibles o antes de que las hojas de la variedad más afectada se cubriera por completo de esporangios. Para determinar el área cubierta por los esporangios se dibujó sobre un acetato el contorno del folíolo completo y el área con la lesión. Se sacaron copias en papel de color, se recortó el contorno que formaba el folíolo y el contorno del área con esporangios, se pasaron por un lector de área foliar. Con las lecturas se estimó el porcentaje del área cubierta por los esporangios.

Capacidad de esporulación. Inmediatamente después de haber trazado el folíolo y el área de la lesión sobre el acetato, los folíolos se colocaron en un vaso de precipitados conteniendo 2.0 ml de agua. Se agitó con un vortex por 15 segundos y se contaron los esporangios obtenidos de los folíolos con un hemacitometro. La

concentración de esporangios se determinó haciendo el promedio de dos lecturas. El número de esporangios por unidad de área de la lesión se calculó dividiendo el total de esporangios entre el área de la lesión de cada foliolo (Mizubuti y Fry, 1998).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Tipo de compatibilidad (MT) y perfiles isoenzimáticos

4.1.1. Aislamientos obtenidos de la variedad Alpha

De los 21 aislamientos obtenidos de esta variedad se identificaron ocho genotipos multilocus basados en las combinaciones de tipo de compatibilidad (A1 y A2) y perfiles isoenzimáticos (*Gpi* y *Pep*). Los genotipos con mayor frecuencia fueron el A1, 86/100, 100/100 con seis aislamientos y el A2, 100/122, 100/100 con cinco aislamientos. Por otro lado los genotipos con menor frecuencia fueron el A2, 86/100, 92/100 y el A2, 86/100, 100/100 con un aislamiento cada uno. Respecto a las proporciones en el tipo de compatibilidad entre el A1 y A2, se encontraron ocho para el primero y 13 para el segundo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Alpha. Toluca, México, 2000.

Genotipo	<i>MT</i>	<i>Gpi</i>	<i>Pep</i>	Frecuencia
1	A1	86/100	100/100	6
2	A1	86/122	100/100	2
3	A2	86/100	92/100	1
4	A2	100/122	100/100	5
5	A2	86/100	100/100	1
6	A2	100/100	100/100	2
7	A2	86/86	96/100	2
8	A2	86/100	96/100	2

4.1.2. Aislamientos obtenidos de la variedad Norteña

Al igual que en la variedad anterior también se presentaron ocho genotipos aunque las frecuencias fueron diferentes encontrándose predominantemente el genotipo A1, 86/100, 100/100, seguida por el genotipo A1, 86/122, 100/100. No obstante la proporción A1 y A2 se mantuvo aproximadamente 1:1 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Norteña. Toluca, México, 2000.

Genotipo	<i>MT</i>	<i>Gpi</i>	<i>Pep</i>	Frecuencia
1	A1	86/100	100/100	5
2	A1	86/122	100/100	4
3	A1	100/100	100/100	1
4	A2	100/122	100/100	3
5	A2	86/86	100/100	1
6	A2	78/100	100/100	3
7	A2	122/122	100/100	1
8	A2	86/100	100/100	1

4.1.3. Aislamientos obtenidos de la variedad Rosita

A pesar de haberse encontrado 10 genotipos diferentes hubo dos predominantes ambos A1 que fueron el A1, 86/100, 100/100 y el A1, 86/122, 100/100. En el resto de

los genotipos solo se encontró un aislamiento de cada uno, principalmente del tipo A2. En total se encontraron 12 A1 y 8 A2 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Rosita. Toluca, México, 2000.

Genotipo	<i>MT</i>	<i>Gpi</i>	<i>Pep</i>	Frecuencia
1	A1	86/100	100/100	6
2	A1	86/122	100/100	5
3	A1	122/122	100/100	1
4	A2	78/100	100/100	2
5	A2	86/100	100/100	1
6	A2	100/122	100/100	1
7	A2	86/122	100/100	1
8	A2	78/122	100/100	1
9	A2	86/86	100/100	1
10	A2	86/100	92/100	1

4.1.4. Aislamientos obtenidos de la variedad Monserrat

En los 12 aislamientos obtenidos de esta variedad solo hubo tres genotipos donde predominó el A2, 86/100, 100/100. En este caso la proporción de A1 y A2 fue de 0.5:1 respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Monserrat. Toluca, México, 2000.

Genotipo	MT	Gpi	Pep	Frecuencia
1	A1	86/100	100/100	3
2	A1	100/122	100/100	1
3	A2	86/100	100/100	8

4.1.5. Aislamientos obtenidos de la variedad Michoacán

De los 24 aislamientos obtenidos de la variedad el 66 % de ellos fueron del genotipo A1, 86/100, 100/100 y el resto varió en todos los aspectos. Cabe destacar que 20 de ellos fueron A1 contra cuatro que fueron A2, guardando una proporción de 1 : 0.20 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Frecuencia de genotipos identificados de aislamientos procedentes de la variedad Michoacán. Toluca, México, 2000.

Genotipo	MT	Gpi	Pep	Frecuencia
1	A1	86/100	100/100	16
2	A1	86/86	100/100	1
3	A1	100/100	100/100	3
4	A2	86/100	100/100	2
3	A2	100/100	100/100	2

En los aislamientos obtenidos de las cinco variedades (Alpha, Rosita, Norteña, Monserrat y Michoacán) las proporciones en el tipo de compatibilidad A1 y A2, variaron dependiendo de donde se obtuvieron los aislamientos, manteniéndose la proporción 1:1 en los aislamientos procedentes de la variedad Norteña semejando a lo reportado por Grünwald *et al.* (2001). Asimismo, los genotipos encontrados en los aislamientos de todas las variedades se han reportado con anterioridad. Encontrándose en mayor proporción el 86/100 para *Gpi* coincidiendo con lo encontrado por Grünwald *et al.* (2001) y Tooley *et al.* (1985), difiriendo con Lozoya-Saldaña *et al.* (2002), en tanto que para *Pep* el más común fue el 100/100 concordando Grünwald *et al.* (2001) y Lozoya-Saldaña *et al.* (2002) y difiriendo con Tooley *et al.* (1985).

4.2. Agrupamiento genético

En el análisis de agrupamiento de las subpoblaciones de los aislamientos por variedad, las distancias genéticas identificaron tres subgrupos; el primero fue de Rosita y Norteña con un coeficiente de similitud de 0.07 y un valor de identidad de 0.989, el segundo incluyó a Alpha y Monserrat con un coeficiente de similitud de 0.07 e identidad de 0.993 y el tercero que únicamente se agrupó a Michoacán que tuvo una similitud con los aislamientos de las variedades anteriores de 0.11, teniendo un valor de identidad con Rosita 0.950 Siendo los aislamientos de la variedad Michoacán los que tuvieron los valores de identidad y similitud más distantes con los aislamientos de las otras variedades (Figura 1).

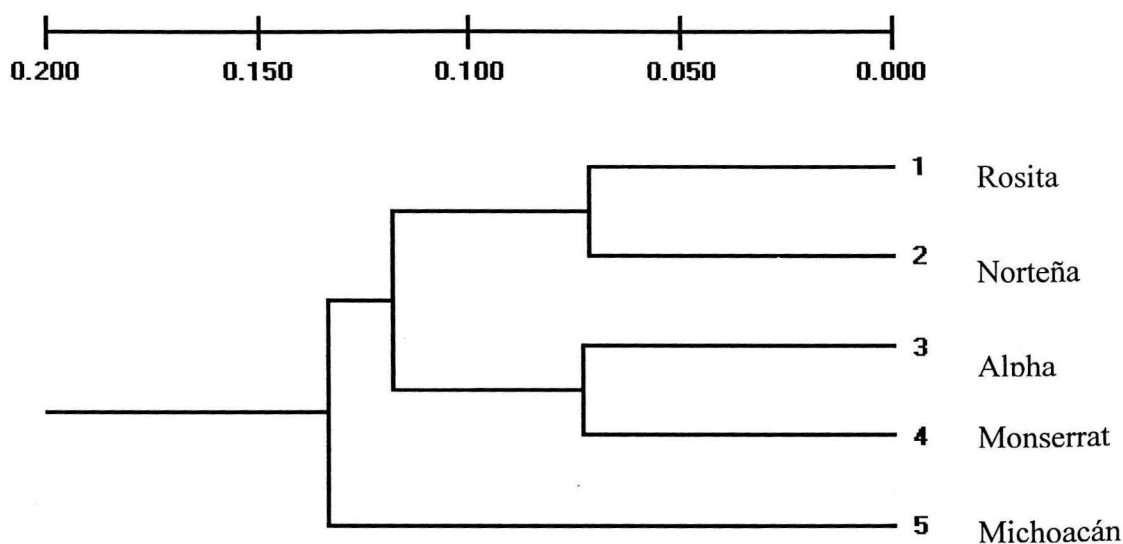


Figura 1. Dendrograma de los genotipos de aislamientos procedentes de las variedades Alpha, Norteña, Rosita, Monserrat y Michoacán.

4.3. Resistencia a metalaxil por variedades

4.3.1. Variedad Alpha

Los aislamientos de esta variedad en la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ se distribuyeron en todos los rangos de crecimiento, inclusive un 14% de ellos creció igual al testigo, considerado como un 100%, aunque el mayor porcentaje de los aislamientos crecieron menos del 60 %. Esto no sucedió con la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ ya que el mayor porcentaje de los aislamientos tuvo un crecimiento con respecto al testigo menor al 20 %. De igual manera se comportó en la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, pero a diferencia de la anterior el máximo desarrollo que logró fue menor al 60%. El porcentaje

de crecimiento, es decir, de resistencia, de los aislamientos en presencia de metalaxil disminuye conforme aumenta la concentración (Figura 2).

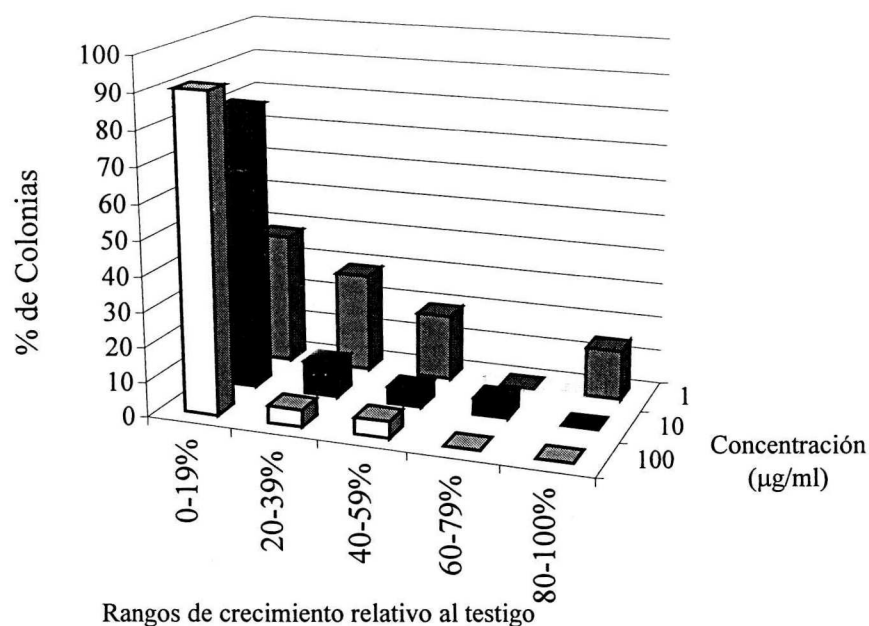


Figura 2. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Alpha.

4.3.2. Variedad Norteña

En los aislamientos de esta variedad se encuentra similitud en el comportamiento con la variedad Alpha en cuanto a la resistencia a metalaxil en la concentración de 1 µg/ml, donde un 10% de la población creció de 60 al 79% del testigo y otro 10% se desarrolló igual que el testigo (100%). En las concentraciones de 10 y 100 µg/ml un porcentaje mayor de aislamientos se ubicaron en un rango de crecimiento mas amplio que en Alpha (Figura 3). La resistencia presentada por el oomiceto estuvo en relación directa a la concentración del producto a la que se expuso.

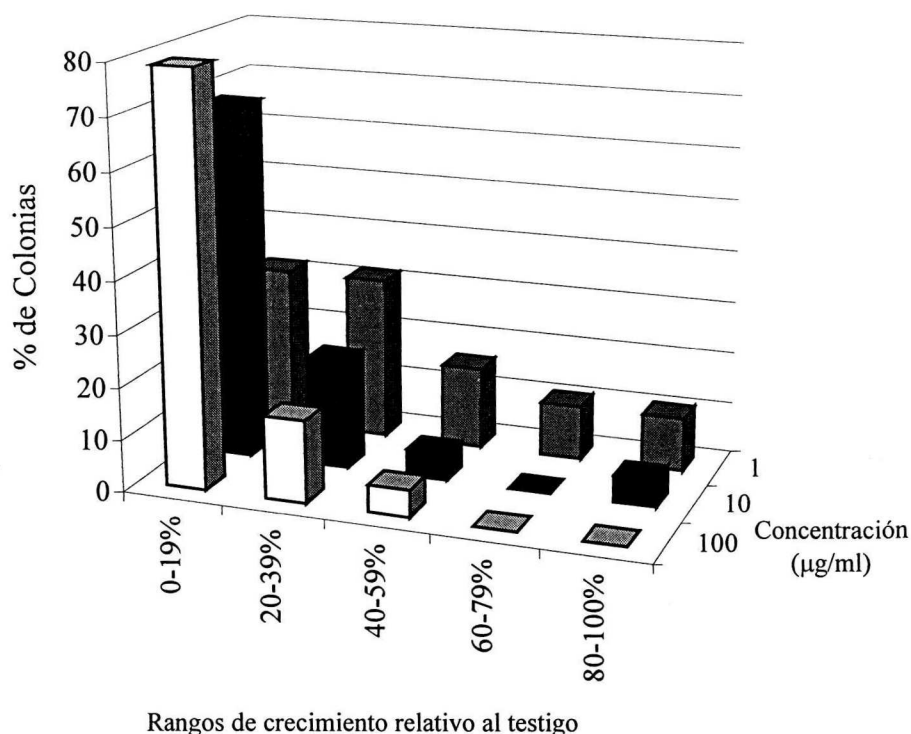


Figura 3. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Norteña.

4.3.3. Variedad Rosita

En los aislamientos de esta variedad en la concentración de 1 µg/ml no se observó la tendencia de las variedades anteriores, notando una diferencia muy marcada del porcentaje de aislamientos que crecieron en un porcentaje menor al 20% que es donde se acumuló la gran mayoría y un bajo porcentaje de aislamientos crecieron en los otros rangos. Una tendencia similar se reflejó en las concentraciones de 10 y 100 µg/ml, donde el crecimiento en la primera no rebasó el 60% y en la segunda el 40%. Con base a

los rangos de crecimiento se puede distinguir que existe mayor diferencia entre los aislamientos procedentes de las variedades Norteña y Rosita (ambas resistentes), que entre las variedades Alpha y Rosita (susceptible y resistente). No existe relación entre los aislamientos de Rosita y Norteña con respecto a resistencia a metalaxil (Figura 4).

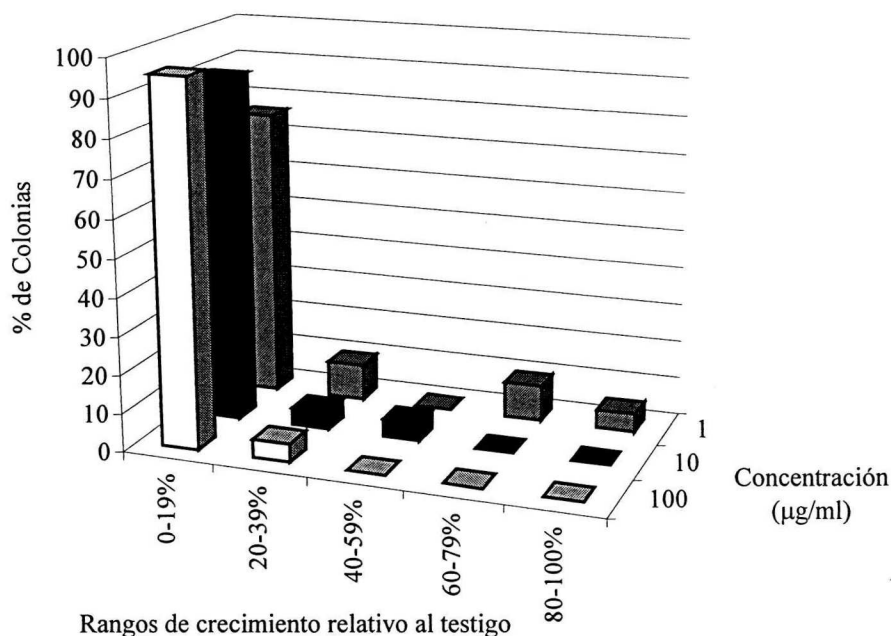


Figura 4. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Rosita.

4.3.4. Variedad Monserrat

Los aislamientos en esta variedad tienen un comportamiento muy similar en las tres concentraciones, agrupándose el mayor porcentaje de aislamientos en el rango de crecimiento de 0-19%, con un porcentaje muy bajo en los rangos restantes. La mayoría de los aislamientos son susceptibles al metalaxil en las concentraciones de 1, 10 y 100

$\mu\text{g/ml}$. Tiene un comportamiento semejante al mostrado por los aislamientos de Rosita, no así con los de Alpha y Norteña (Figura 5).

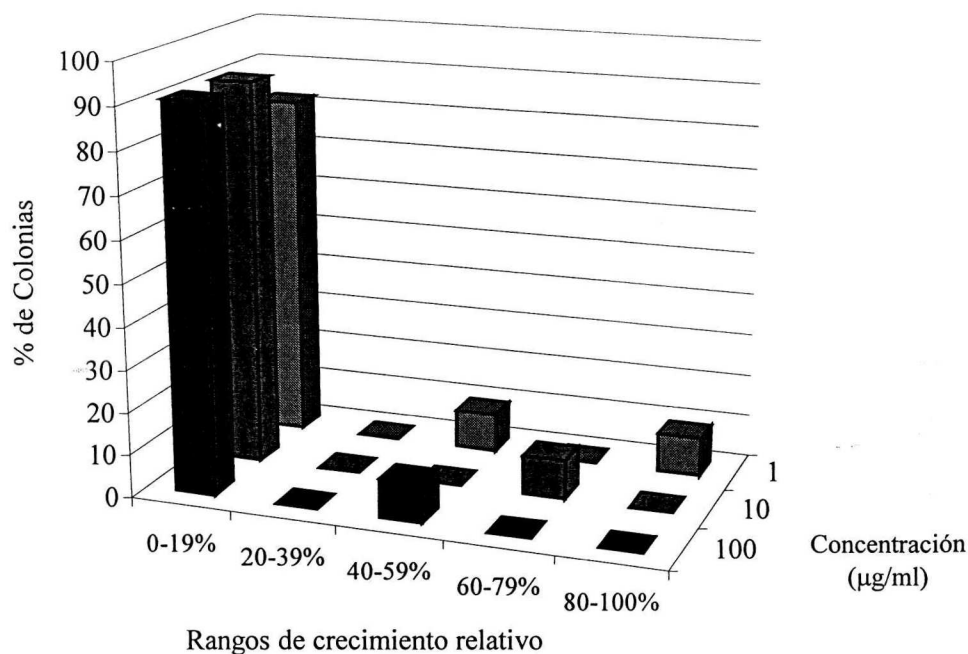


Figura 5. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Monserrat.

4.3.5. Variedad Michoacán

Los aislamientos procedentes de esta variedad muestran un comportamiento totalmente distinto a las demás variedades. La mayor proporción de aislamientos en la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ tuvieron un crecimiento igual que el testigo. En la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ los aislamientos se distribuyeron en todos los rangos de crecimiento relativo (del 0 al 100%). En la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se comportaron

de manera similar a los aislamientos de las otras variedades, donde el mayor porcentaje de aislamientos se concentró en el rango de 0-19% y el máximo crecimiento fue menor al 60% (Figura 6).

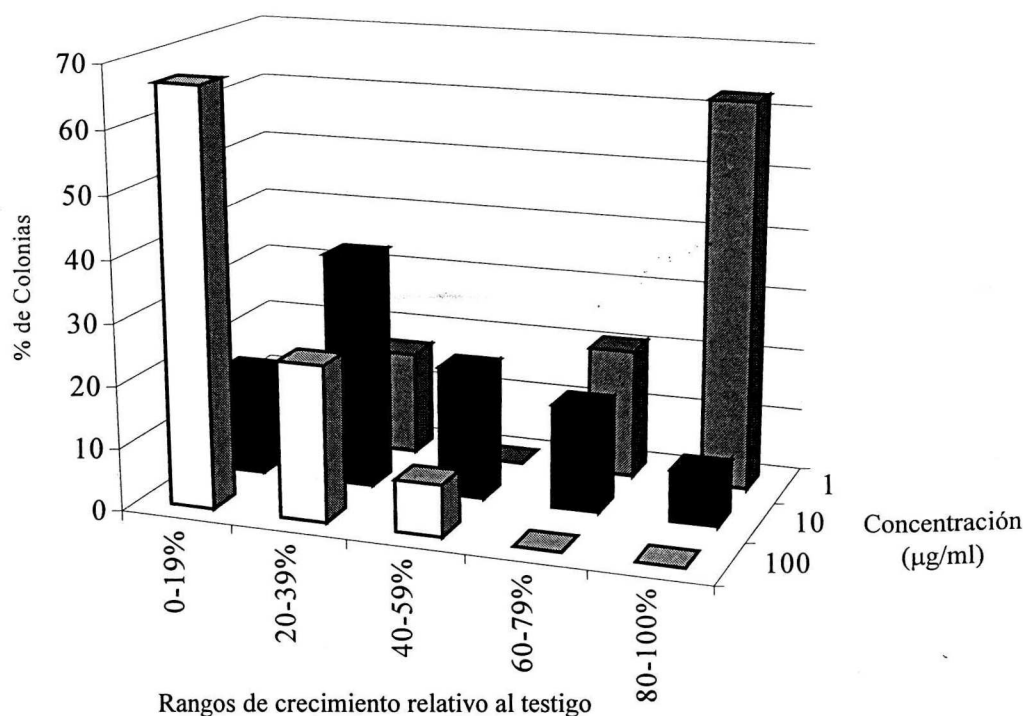


Figura 6. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de la variedad Michoacán.

4.4. Resistencia a metalaxil por concentración

4.4.1. Concentración de 1 µg/ml de metalaxil

En esta concentración los aislamientos de las variedades Alpha y Norteña se distribuyeron en todos los rangos de crecimiento, en tanto que los aislamientos de Rosita y Monserrat el mayor porcentaje de los aislamientos se concentró en un crecimiento menor al 20 %, en la variedad Michoacán se observó un comportamiento diferente a las

demás ya que cerca del 60% de los aislamientos tuvieron un crecimiento similar al testigo en presencia del metalaxil a esta concentración (Figuras 7A, 7B y 8).

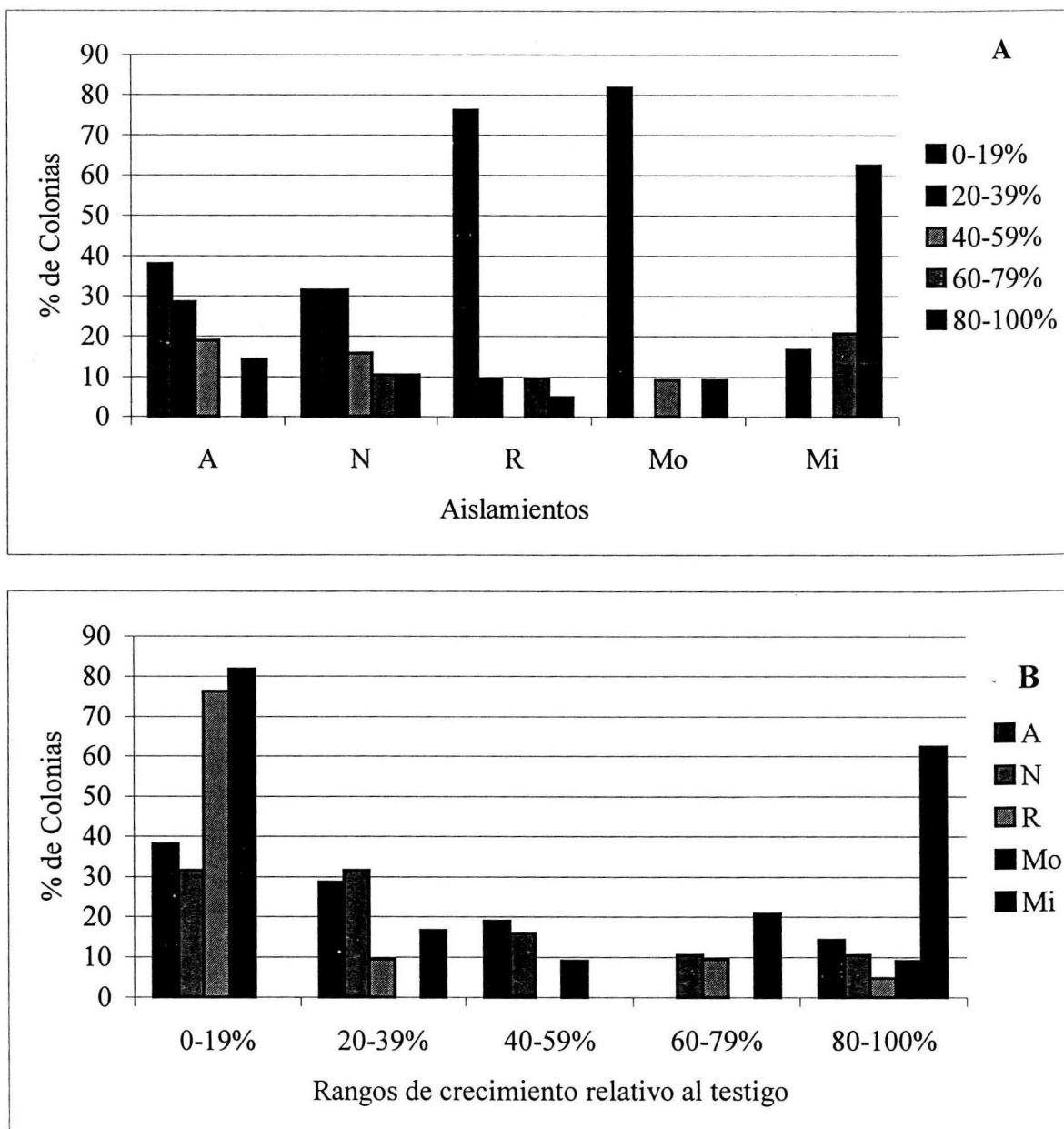


Figura 7. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de aislamientos con 1 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa. A, agrupados por variedad; B, agrupados por rangos.

A=Alpha,, N=Norteña, R=Rosita, Mo=Moserrat, Mi=Michoacán.

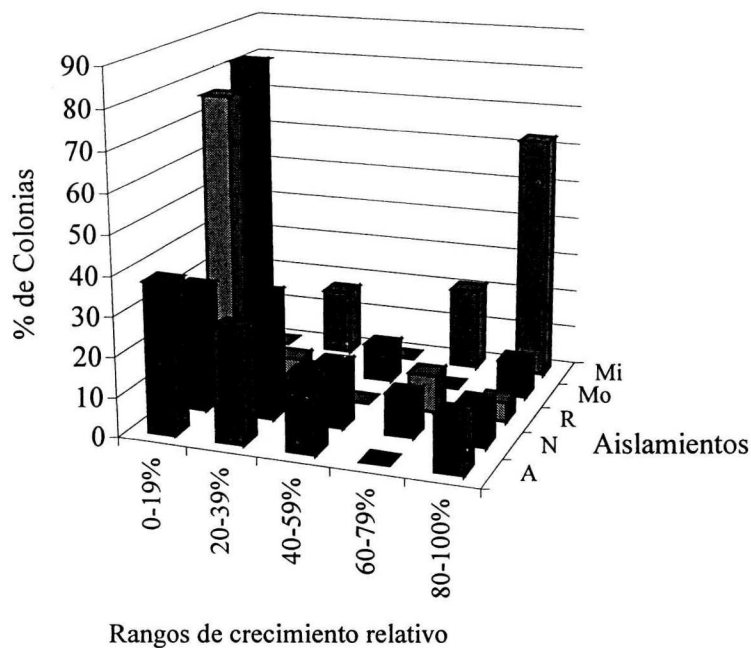


Figura 8. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de cinco variedades de papa expuestos a 1 µg/ml de metalaxil.

4.4.2. Concentración de 10 µg/ml de metalaxil

Al igual que en la concentración de 1 µg/ml, los aislamientos tuvieron un crecimiento menor al 20% en las variedades Alpha, Norteña, Rosita y Monserrat, no así con Michoacán que hubo una distribución en todos los rangos de crecimiento de sus aislamientos, encontrando una mayor variación en cuanto a la resistencia al metalaxil a esta concentración (Figura 9A, 9B y 10).

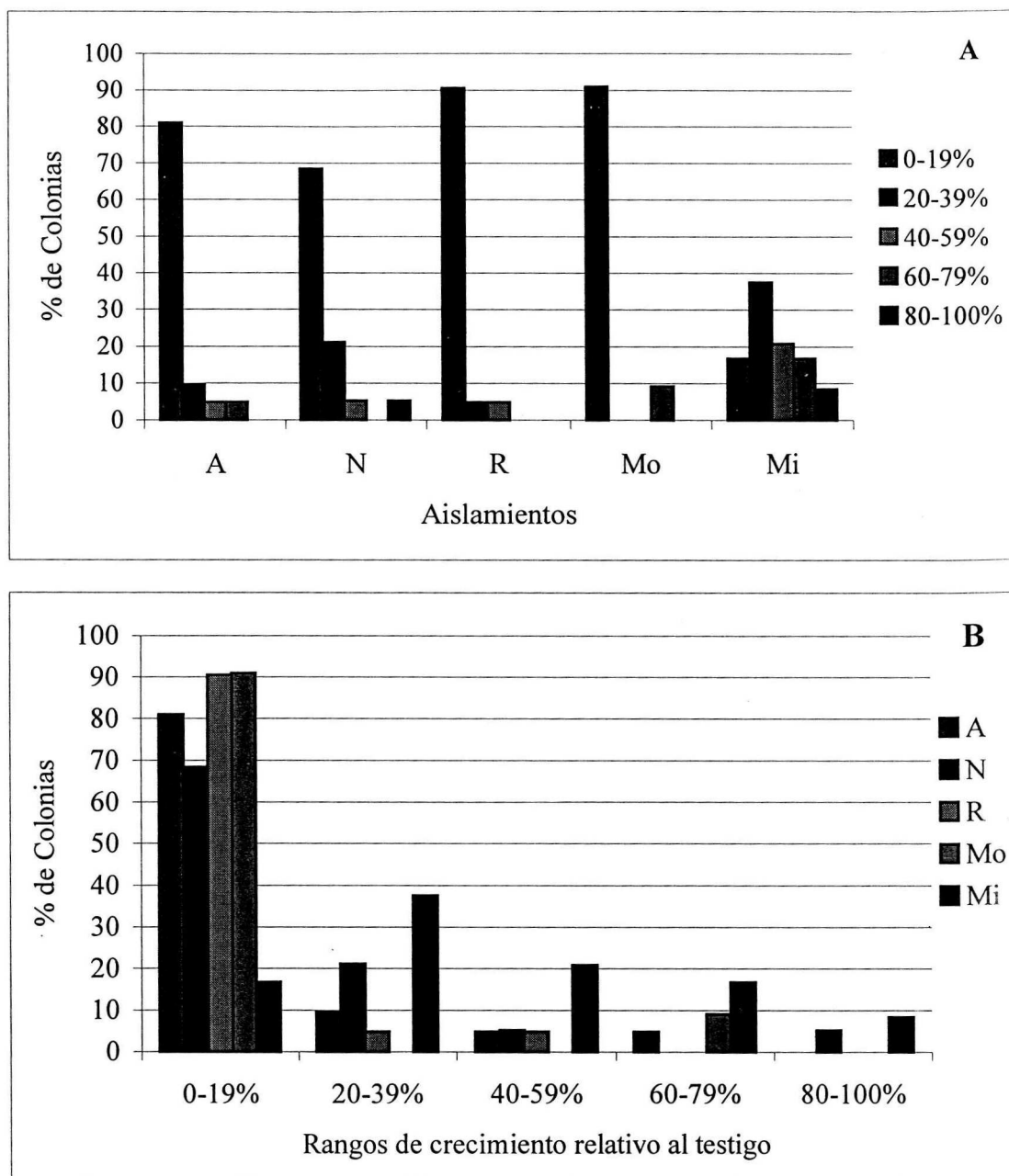


Figura 9. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa. A, por variedad; B, por rangos

A=Alpha, N=Norteña, R=Rosita, Mo=Montserrat y Mi=Michoacán.

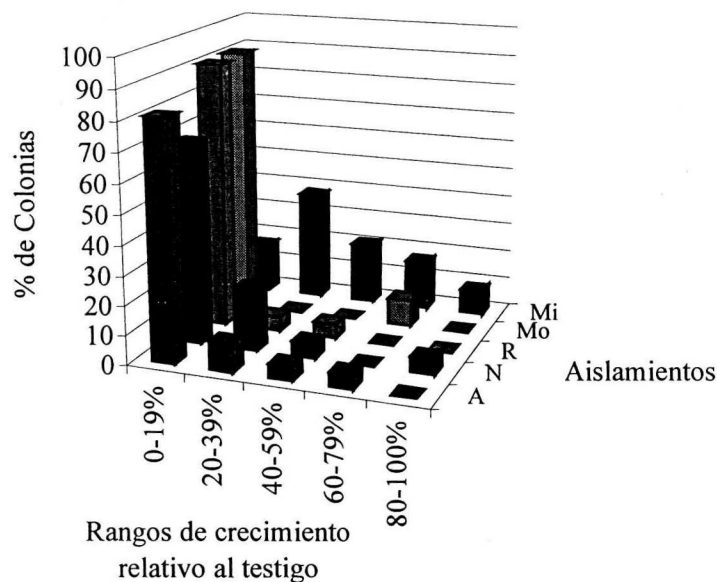


Figura 10. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 10 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa.

4.4.3. Concentración de 100 µg/ml de metalaxil

El mayor porcentaje de los aislamientos mostraron susceptibilidad a esta dosis, el máximo crecimiento que mostraron fue del 60% que se presentaron en las variedades Alpha, Norteña, Monserrat y Michoacán. En tanto que los aislamientos de Rosita fueron los que presentaron mayor susceptibilidad a esta concentración de metalaxil presentado un crecimiento menor al 40% con respecto al testigo en todos los aislamientos (Figuras 11A, 11B y 12). Esta susceptibilidad posiblemente se deba a la poca aplicación del fungicida para el control de *P. infestans* en esta variedad.

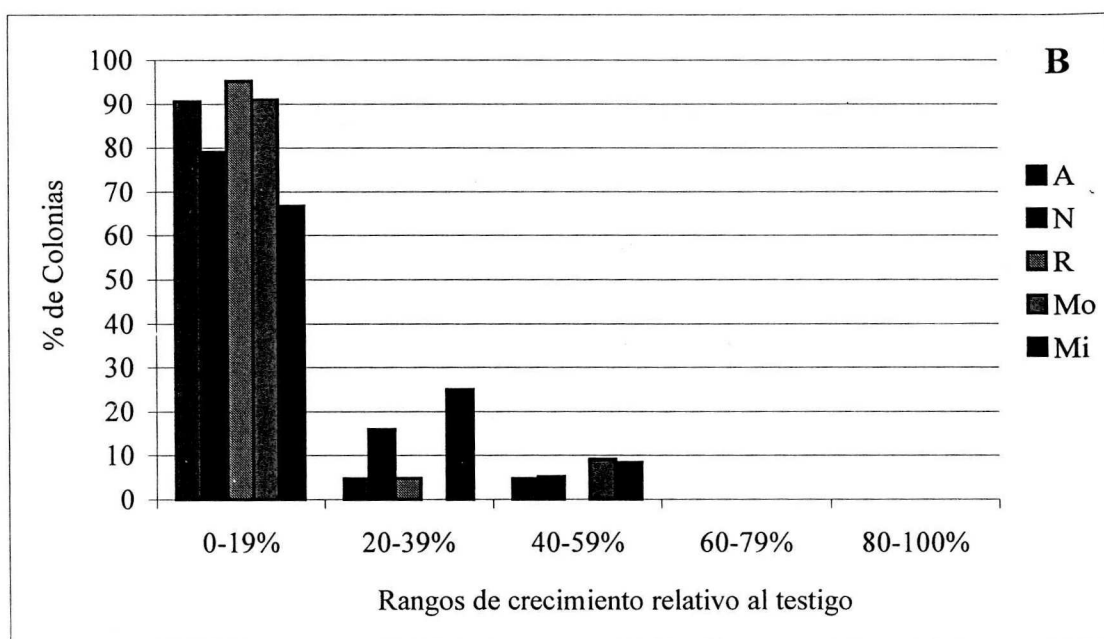
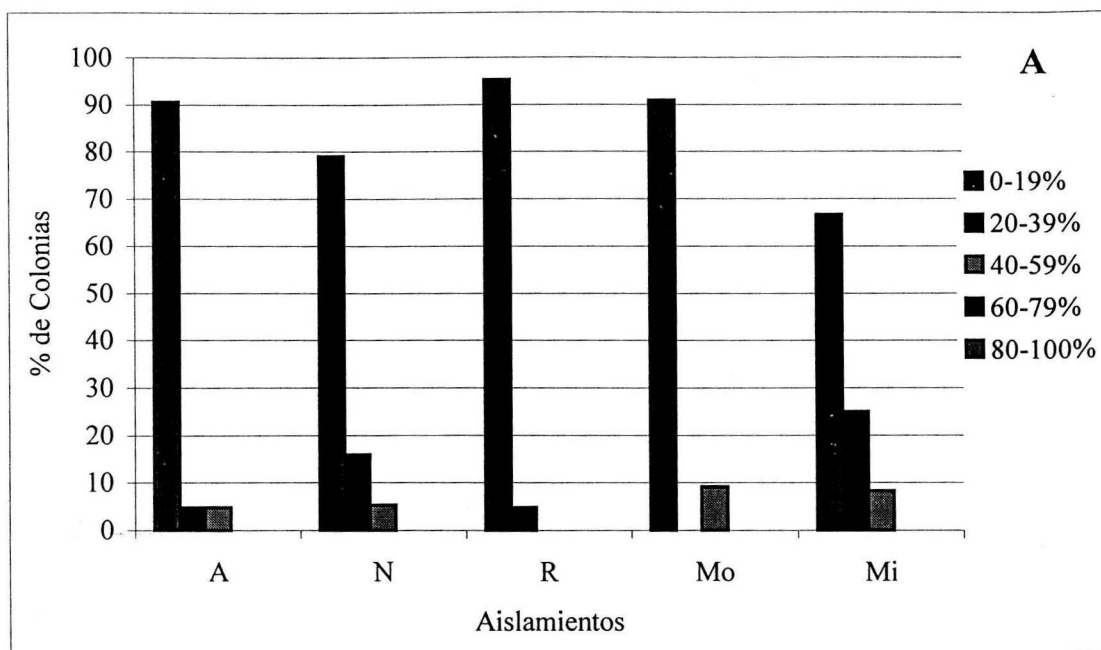


Figura 11. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 100 μ g/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa. A, por variedad; B, por rango.

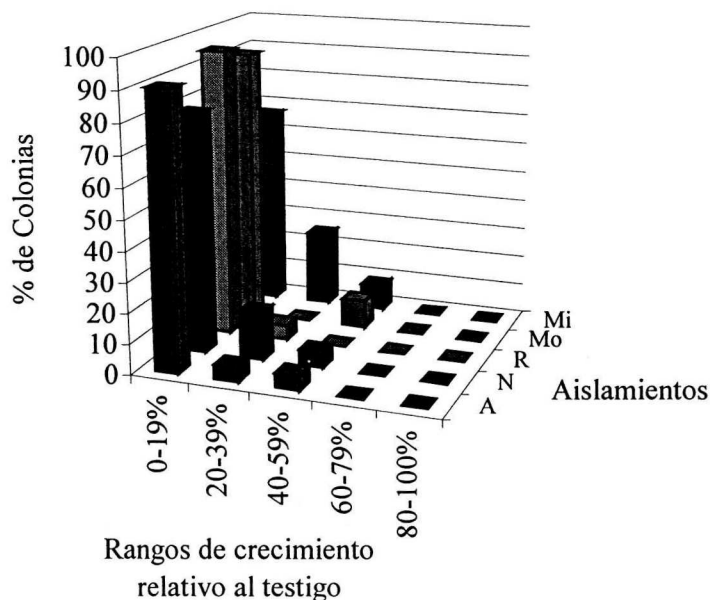


Figura. 12. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con 100 µg/ml de metalaxil procedentes de cinco variedades de papa.

4.5. Resistencia a metalaxil por rangos de crecimiento relativo

Independientemente de la variedad de papa de donde se obtuvieron los aislamientos la mayoría de estos no superó el 20% de avance en su crecimiento cuando las dosis fueron de 10 y 100 µg/ml. Con la dosis más baja también el mayor número de los aislamientos no superó al 20% pero, si hubo crecimiento hasta un 100% en un limitado número de aislamientos. De igual manera en presencia de 10 µg/ml hubo aislamientos selectos que si prosperaron y definitivamente no hubo crecimiento superior al 59% cuando el metalaxil estaba presente en 100 µg/ml (Figura 13).

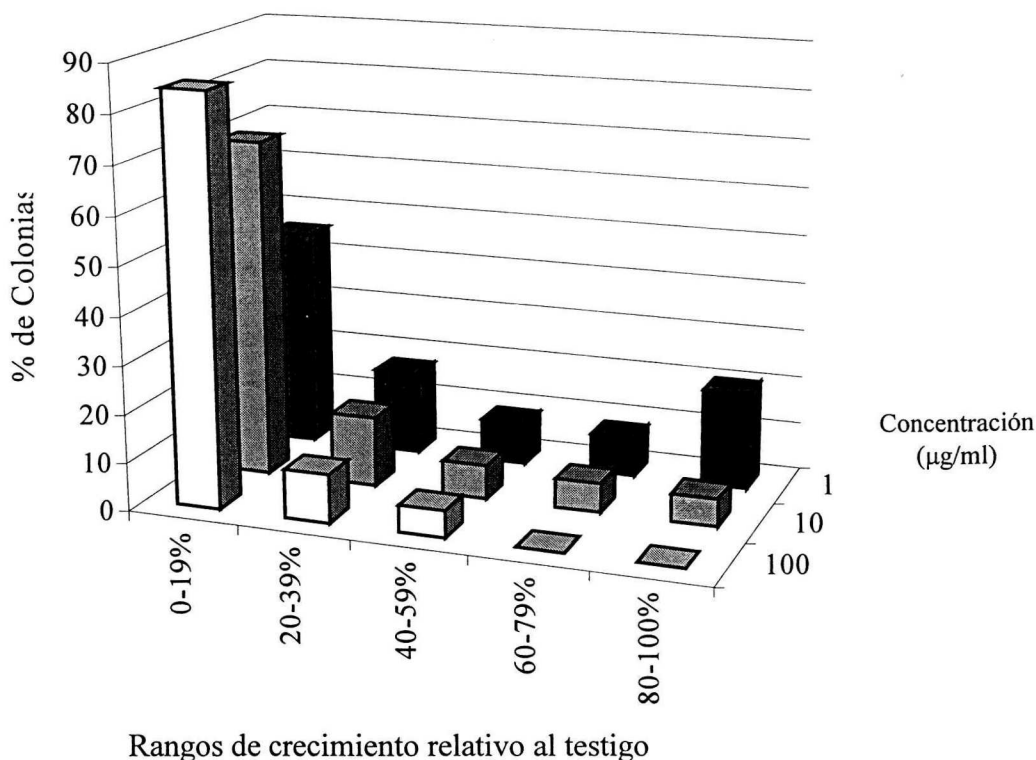


Figura 13. Distribución de porcentajes de colonias en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos con metalaxil a 1, 10 y 100 µg/ml procedentes de cinco variedades de papa.

Los resultados encontrados coinciden con los de Matuszak *et al.* (1994) y Grünwald *et al.* (2001) quienes encontraron que a 5 µg/ml el mayor número de aislamientos tuvo un crecimiento relativo menor al 20% pero, hubo aislamientos que crecieron en un 80% o más. En la concentración de 100 µg/ml en las cinco variedades no hubo crecimiento mayor al 60% en tanto que, en los aislamientos realizados por Matuszak *et al.* (1994) y Grünwald *et al.* (2001) mostraron crecimiento en el rango de 80 al 100%.

Aunado a lo anterior los resultados demuestran que aproximadamente un 10% de los patotipos obtenidos de Norteña y Michoacán fueron capaces de crecer igual que el testigo (100%) en presencia de 10 µg/ml de metalaxil, por lo que el patógeno podría estar evolucionando hacia la resistencia al producto y superación de resistencia genética de estas variedades, como dos caracteres ligados. La aplicación de metalaxil en Norteña y Michoacán en el campo podría favorecer el surgimiento, incremento y dispersión de patotipos con las características mencionadas.

La sensibilidad a metalaxil de los aislamientos procedentes de las cinco variedades presentaron un comportamiento similar a los reportados con anterioridad. A una concentración de 100 µg/ml permitió un crecimiento menor al 60%, en tanto que a 1 y 10 µg/ml hubo aislamientos que crecieron hasta en un 100%, semejando con lo reportado por Sujkowski *et al.* (1995) y Matuszak *et al.* (1994), pero sin coincidir con Grünwald *et al.* (2001).

4.6. Componentes de resistencia en condiciones de laboratorio

4.6.1. Por aislamientos

Bajo condiciones de laboratorio el aislamiento procedente de Alpha inoculado sobre esta misma variedad presentó el menor porcentaje de área dañada pero produjo mas esporangios que en Rosita (62.7 % de área dañada en Alpha y 86.9 % de Rosita; con 168,170 esporangios/ml para la primera contra 101,000 para la segunda). De igual manera, Rosita tuvo mayor área dañada con el aislamiento obtenido de ella misma que

con los del resto de las variedades, pero con el aislamiento de Alpha se obtuvieron un mayor número de esporangios y registró un tiempo mayor en la aparición de estos. En tanto con el aislamiento procedente de Norteña la variedad Rosita fue la que tuvo mayor esporulación y área dañada, sin tener diferencias significativas para las tres variables con Alpha, sin embargo con Norteña si se presentaron diferencias significativas en las dos variables anteriores pero en el periodo latente estadísticamente fueron iguales las tres variedades para este aislamiento (Cuadro 6).

Cuadro 6. Periodo latente, porcentaje de área dañada y esporulación de aislamientos procedentes de Alpha, Rosita y Norteña bajo condiciones de laboratorio.

A I S L A M I E N T O									
Variedad inoculada	De Alpha			De Rosita			De Norteña		
	P.L	Area (%)	Esp.	P.L	Area (%)	Esp.	P.L	Area (%)	Esp.
Alpha	84 ^{a*}	62.7 ^b	168,170 ^a	84 ^a	74.6 ^b	73,500 ^a	80 ^a	51 ^{ab}	20,667 ^a
Rosita	80 ^a	86.9 ^a	101,000 ^a	74 ^{ab}	91.7 ^a	46,167 ^b	78 ^a	56.1 ^a	22,333 ^b
Norteña	0 ^b	0 ^c	0 ^b	68 ^b	51.4 ^c	37,167 ^b	84 ^a	29.0 ^b	5,667 ^b

P.L. Periodo latente. Horas transcurridas entre la inoculación y la aparición de los primeros esporangios.

Area (%). Porcentaje del área del foliolo con daños del patógeno con respecto al área total.

Esp. Promedio del número de esporangios/ml por foliolo.

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

4.6.2. Por variedad

Al comparar las reacciones de los diferentes aislamientos por variedad, en Alpha inoculada con aislamiento de ella misma se observó que con una menor área dañada (62.7%) presentó una mayor esporulación (168,170) con diferencia significativa con los otros aislamientos, pero en el período latente no se presentó diferencia significativa entre los aislamientos inoculados sobre ésta variedad (Cuadro 7).

En la variedad Rosita con la misma área dañada sin diferencia estadística entre los aislamientos de Rosita y Alpha (91.7% Y 86.9 % respectivamente) el aislamiento procedente de Alpha esporuló más que el de Rosita con diferencia significativa entre ambos (101,000 y 46,167 esporangios/ml respectivamente), sin diferencias significativas entre en período latente entre los aislamientos (Cuadro 7).

En la variedad Norteña el aislamiento que presentó el menor periodo latente, el mayor porcentaje de área dañada y esporulación fue el aislamiento procedente de Rosita mostrando en los tres componentes diferencia significativa con los otros aislamientos. Cabe señalar que el aislamiento tomado de Alpha no logró infectar a esta variedad, observándose una reacción de hipersensibilidad (Cuadro 7). Esto se puede atribuir a que los aislamientos de Alpha no tengan los genes de virulencia para lograr la infección en Norteña y a que ésta variedad presenta resistencia hacia el patógeno.

Cuadro 7. Periodo latente, porcentaje de área dañada y esporulación entre las variedades Alpha, Rosita y Norteña bajo condiciones de laboratorio.

Aislamiento	VARIEDADES INOCULADAS								
	Alpha			Rosita			Norteña		
	PL	rea (%)	Esp.	PL	Area (%)	Esp.	PL	Area (%)	Esp.
A	84 ^{a*}	62.7 ^{ab}	168,170 ^a	80 ^a	86.9 ^a	101,000 ^a	0 ^c	0 ^c	0 ^b
R	84 ^a	74.6 ^a	73,500 ^b	74 ^a	91.7 ^a	46,170 ^b	68 ^b	51.5 ^a	37,167 ^a
N	80 ^a	51 ^b	20,670 ^b	78 ^b	56.1 ^b	22,330 ^b	84 ^a	29.0 ^b	5,667 ^b

P.L. Periodo latente. Horas transcurridas entre la inoculación y la aparición de los primeros esporangios.

Area (%). Porcentaje del área del foliolo con daños del patógeno con respecto al área total.

Esp. Promedio del número de esporangios/ml por foliolo.

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

4.6.3. Por variedades, independiente del aislamiento

En Alpha y Rosita se observó mayor esporulación que en Norteña, independientemente del aislamiento, en concordancia con el área dañada e inversamente proporcional al periodo latente es decir, a mayor área en la lesión correspondió mayor esporulación y menor tiempo. Norteña por otro lado, fue diferente a ellas en ambos parámetros, con un periodo corto de latencia (Cuadro 8).

Cuadro 8. Periodo latente, porcentaje de área dañada y esporulación en las variedades Alpha, Rosita y Norteña bajo condiciones de laboratorio.

Variedad	Periodo latente	Area dañada (%)	Esporangios/ml
Alpha	82.6 a*	62.7 a	87,440 a
Rosita	77.3 a	78.2 a	56,500 a
Norteña	50.6 b	26.8 b	14,280 b

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

4.6.4. Combinación aislamiento-variedad

En todas las combinaciones de aislamiento por variedad no existieron diferencias significativas en el periodo latente, excepto el aislamiento procedente de Rosita sobre Norteña fue el que tuvo el periodo mas corto. El período de incubación fluctuó entre 74 y 84 hr con diferencias mínimas significativas entre las combinaciones. La variedad Norteña no fue infectada por el aislamiento de Alpha, por lo que no hubo datos en este caso (Cuadro 9, Fig. 14). El área dañada si varió entre las combinaciones, siendo mayor en la variedad Rosita con su propio aislamiento, aunque sin diferencia estadística con la lesión en Alpha del mismo aislamiento de Rosita y la de Rosita inoculada con la cepa de Alpha. El menor daño se observó en Norteña con aislamiento de esta misma variedad (Cuadro 9 y Figura 15A). Alpha con su cepa indujo mayor esporulación, seguida por el mismo aislamiento en Rosita, y nuevamente Norteña con su aislamiento generó la menor cantidad de esporangios, teniendo diferencias significativas sobre las demás combinaciones de aislamiento-variedad (Cuadro 9, Fig. 15B).

Cuadro 9. Periodo latente, porcentaje de área dañada y esporulación en la combinación aislamiento-variedad, bajo condiciones de laboratorio.

Aislamiento-Variedad	Periodo latente	Area dañada (%)	Esporangios/ml
A – Alpha	84 a*	62.7 b	168,170 a
A – Rosita	80 a	86.9 a	101,000 b
A – Norteña	0 c	0.0 d	0.0 d
R – Alpha	84 a	74.6 ab	73,500 bc
R – Rosita	74 ab	91.7 a	46,170 bcd
R – Norteña	68 b	51.5 bc	37,170 cd
N – Alpha	80 a	51.0 bc	20,670 cd
N – Rosita	78 ab	56.1 b	22,230 cd
N -- Norteña	84 a	29.0 c	5,670 d

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

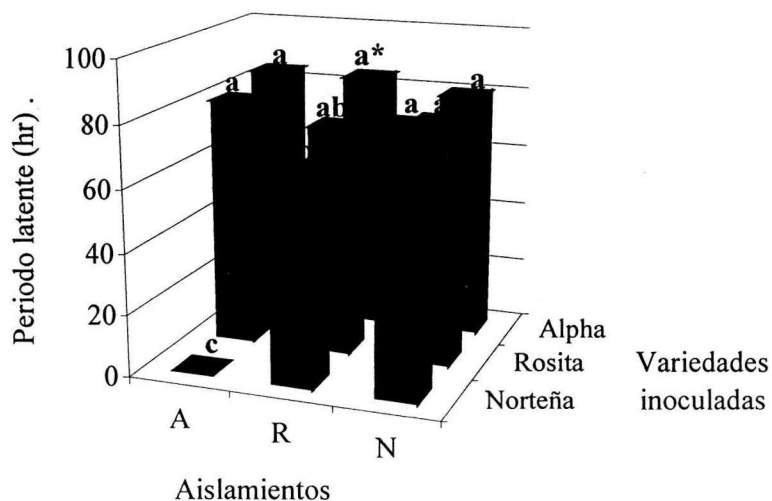


Figura. 14. Periodo latente de los aislamientos sobre las variedades de donde se obtuvieron, bajo condiciones de laboratorio.

* Medias con la misma letra son significativamente iguales. (Tukey= $\alpha=0.05$).

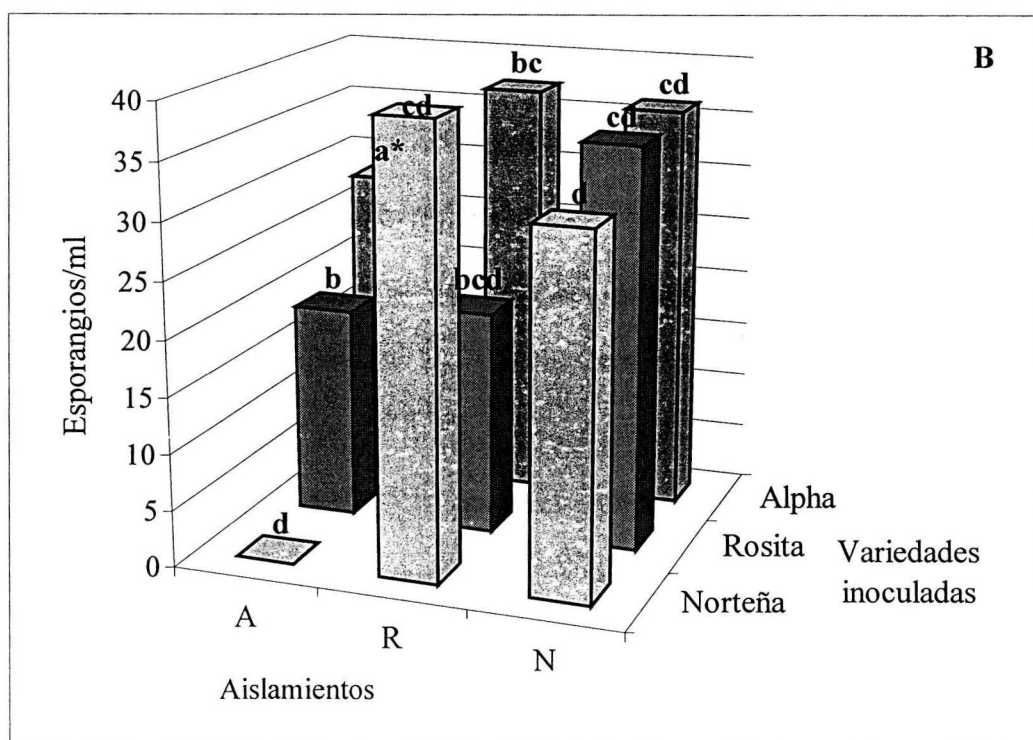
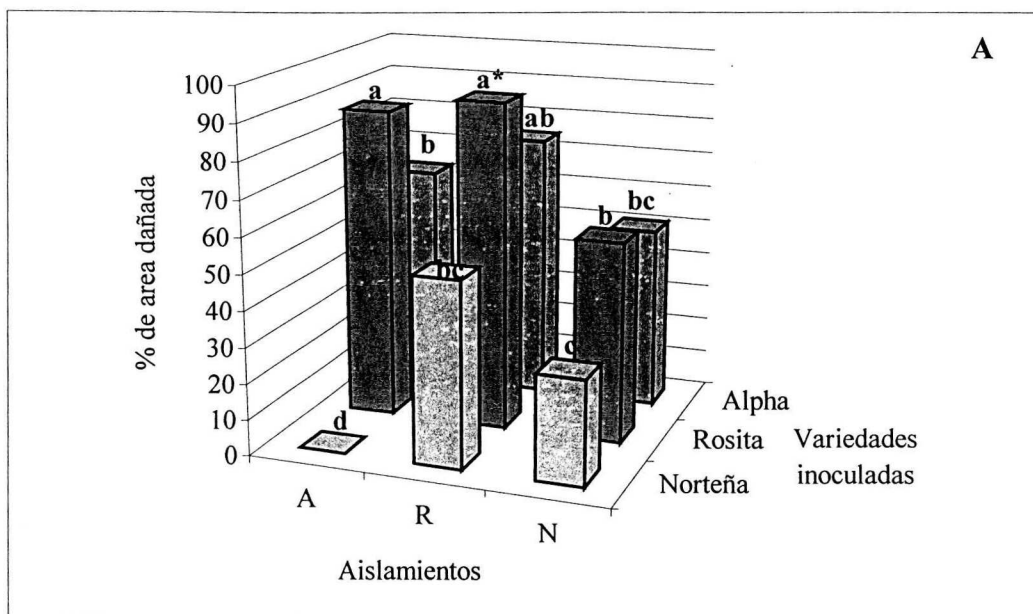


Figura. 15. Porcentaje de área dañada (A) y esporulación de los aislamientos (B) sobre las variedades de donde se obtuvieron, bajo condiciones de laboratorio.

* Medias con la misma letra son significativamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

4.7. Componentes de resistencia en condiciones de invernadero

Bajo condiciones de invernadero no se incluyó el periodo latente porque las condiciones ambientales no hicieron confiables las mediciones de esta variable.

4.7.1. Por aislamientos

Bajo condiciones de invernadero el aislamiento de la variedad Alpha indujo mayor área dañada y mayor esporulación que el resto, con significancia estadística, mientras que Norteña no fue colonizada. El aislamiento de Rosita sobre las tres variedades produjo menor área dañada, menor numero de esporangios y menor periodo latente en Rosita misma, siendo la variedad Alpha la que presentó mayor esporulación con este aislamiento. Con respecto al aislamiento de Norteña no hubo diferencias significativa en el porcentaje de área dañada entre las tres variedades, pero si en esporulación donde Alpha superó al resto (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de área dañada y esporulación de los aislamientos procedentes de Alpha, Norteña y Rosita, bajo condiciones de invernadero.

AISLAMIENTO						
Variedad inoculada	De Alpha		De Rosita		De Norteña	
	Area (%)	Esporulación	Area (%)	Esporulación	Area (%)	Esporulación
Alpha	28.2 a*	110,830 ^a	37.2 a	151,500 a	36.1 a	45,000 a
Rosita	18.9 b	21,170 b	19.9 b	33,000 b	35.6 a	20,500 b
Norteña	0 c	0 c	39.3 a	75,000 ab	31.5 a	13,667 b

Área (%). Porcentaje del área del foliolo con daños del patógeno con respecto al área total.

Esporulación. Promedio del número de esporangios/ml por foliolo.

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

4.7.2. Por variedad

Al comparar las reacciones de los diferentes aislamientos por variedad en invernadero, en Alpha los tres aislamientos no presentaron diferencias significativas en porcentaje de área dañada siendo iguales estadísticamente, no así en cuanto a la esporulación pues los de Rosita y Alpha fueron los más prolíficos sin presentar diferencias significativas entre ellos (Cuadro 11).

En Rosita si hubo diferencias significativas en porcentaje de área dañada siendo el aislamiento de Norteña el que presentó la mayor área, pero en la producción de esporangios los tres aislamientos no presentaron diferencias significativas. En la variedad Norteña el aislamiento que tuvo una mayor área dañada y el mayor número de esporangios fue el realizado de Rosita, seguido por el de Norteña, y al igual que en laboratorio, el aislamiento de Alpha no logró infectar a ésta variedad (Cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de área dañada y esporulación entre las variedades Alpha, Rosita y Norteña, bajo condiciones de invernadero

VARIEDADES INOCULADAS						
Aislamiento	Alpha		Rosita		Norteña	
	Área (%)	Espor./ml	Area (%)	Espor.	Area (%)	Espor.
De Alpha	28.2 a*	110,830 ab	18.9 b	21,170 a	0 b	0 b
De Rosita	37.2 a	151,500 a	19.9 b	33,000 a	39.3 a	75,000 a
De Norteña	36.2 a	45,000 b	35.6 a	20,500 a	31.5 a	13,670 b

Espor.= Promedio del numero de esporangios/ml por foliolo

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey (=0.05)

4.7.3. Por variedades, independiente del aislamiento

En estas condiciones no se observaron diferencias significativas en el área dañada pero si en el número de esporangios producidos, siendo Alpha la que superó claramente a las otras dos variedades (Cuadro 12).

Cuadro 12. Porcentaje de área dañada y esporulación en las variedades Alpha, Norteña y Rosita, sin tomar en cuenta el origen del aislamiento, bajo condiciones de invernadero.

Variedad	Area dañada (%)	Esporangios/ml
Alpha	33.8 a*	102,440 a
Rosita	24.8 a	24,890 b
Norteña	23.6 a	29,560 b

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

4.7.4. Combinación aislamiento-variedad

Los aislamientos procedentes de Rosita y Alpha inoculados sobre Alpha produjeron el mayor numero de esporangios (Cuadro 13, Figura 16B). En cuanto al área dañada el aislamiento de Rosita inoculado sobre Alpha y Norteña fue el que tuvo el mayor porcentaje (Cuadro 13 y Figura 16A).

Cuadro 13. Porcentaje de área dañada y esporulación en la combinación aislamiento-variedad en Alpha, Rosita y Norteña, bajo condiciones de invernadero.

Aislamiento-variedad	Area dañada (%)		E孢angios/ml	
A -- Alpha	28.2	abc*	110,830	ab
A -- Rosita	18.9	c	21,170	c
A -- Norteña	0	d	0	c
R -- Alpha	37.2	a	151,500	a
R -- Rosita	19.9	bc	33,000	c
R -- Norteña	39.3	a	75,000	abc
N -- Alpha	36.1	ab	45,000	bc
N -- Rosita	35.6	ab	20,500	c
N -- Norteña	31.5	abc	13,670	c

* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

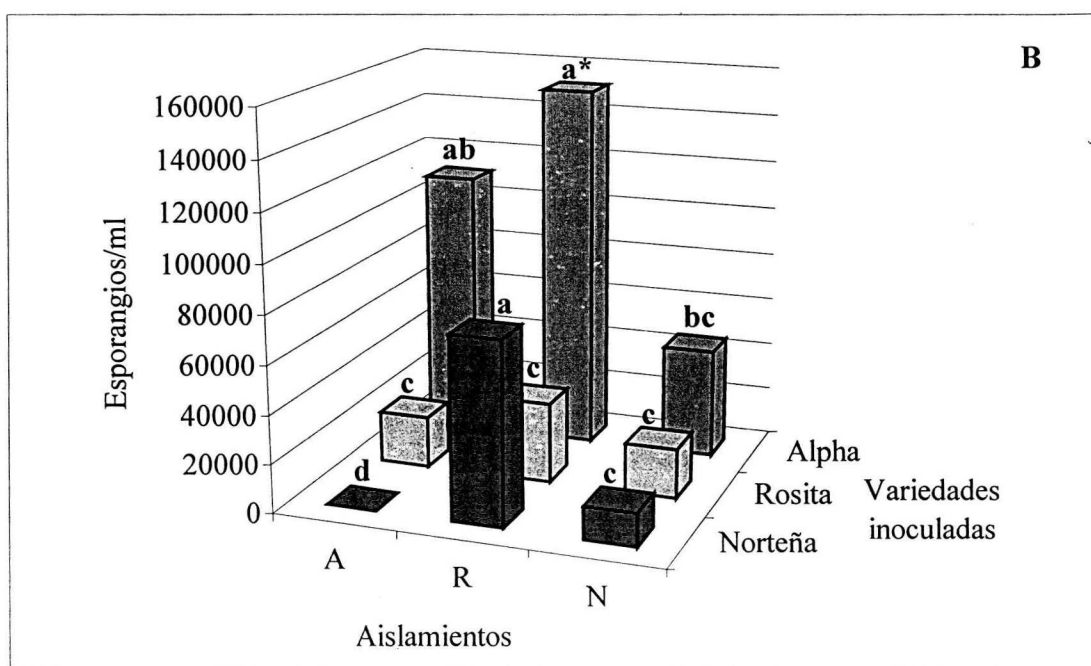
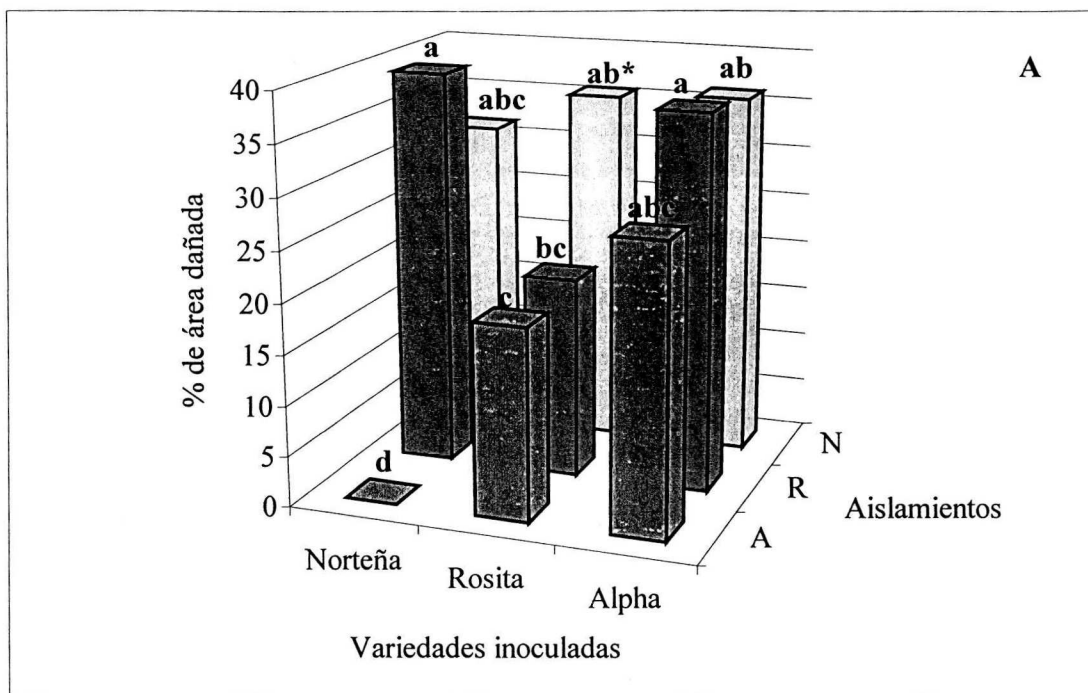


Figura 16. Porcentaje de área dañada (A), y esporulación (B), de los aislamientos sobre las variedades de donde se obtuvieron, bajo condiciones de invernadero.

* Medias con la misma letra son significativamente iguales. Tukey ($\alpha=0.05$).

Bajo condiciones de invernadero y laboratorio se detectó que el aislamiento de Alpha aparentemente tiene pocos genes de virulencia pues afectó severamente a la variedad susceptible (Alpha), medianamente a la intermedia en resistencia (Rosita) y hubo ausencia de infección en la resistente (Norteña).

El periodo latente, el área de la lesión y la capacidad de esporulación fueron componentes en la resistencia de las variedades Alpha, Rosita y Norteña a *P. infestans*, coincidiendo en lo reportando por Guzmán (1964).

V. CONCLUSIONES

- Las proporciones en el tipo de compatibilidad A1 y A2 del oomiceto no presentaron relación alguna respecto al grado de resistencia o susceptibilidad genética del hospedante del que se obtuvieron. Considerando todas las variedades incluidas en el presente estudio, la resistencia o susceptibilidad de la planta no influyó sobre la predominancia de algún grupo específico de compatibilidad.
- Se identificaron 18 genotipos multilocus de *P. infestans* con base a su grupo de compatibilidad y sus perfiles isoenzimáticos. Todos han sido previamente reportados.
- Los aislamientos obtenidos, estudiados e incluidos en este estudio, presentaron un comportamiento similar al reportado con anterioridad en su sensibilidad al metalaxil.
- Con base a los componentes de resistencia estudiados, existió una relación directa entre la agresividad del patógeno y el nivel de resistencia genética del hospedante del que se obtuvieron.

I. LITERATURA CITADA

- Cañizares, C. A. and Forbes, G. A. 1995. Foliage resistance to *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary in the Ecuadorian national collection of *Solanum phureja* ssp. *phureja* Juz. and Buk. Potato Res. 38: 3-10.
- Colon, T. L., Budding, D.J., Keizer, L.C.P. and Pieters, M.M.J. 1995. Components of resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in eight South American *Solanum* species. Eur. Jour. Plant Pathol. 101:441-456.
- Daayf, H. W. F. , Mahuku, G. and Peters, R. D. 2001. Relationships between pathotypes and RAPDs, *Gpi*-allozyme patterns, mating types, and resistance to metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. Amer. J. of Potato Res. 78:129-139.
- Dagget, S.S., Götz, E., and Therrien, C.D. 1993. Phenotypic changes in populations of *Phytophthora infestans* from eastern Germany. Phytopathology 83:319-323.
- Davidse, L.C., Looijen, D., Turkensteen J. L. and Van der Val, D. 1981. Ocurrance of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. Netherlands J. Plant Path. 87:65-68.

- Deahl, K. L., Demuth, S.P., Sinden S.L., and Rivera-Peña, A. 1995. Identification of mating types and metalaxyl resistance in north american populations of *Phytophthora infestans*. Amer. Potato J. 72:35-49.
- Dorrance, E. A., Inglis, D. A., Helgelson, J. P. and Brown, R. C. 2001. Partial resistance to *Phytophthora infestans* in four *Solanum* crosses. Amer. J. of Potato Res. 78:1-17.
- Drenth, A. and Govers F. 1994. DNA fingerprinting of the potato late blight fungus, *Phytophthora infestans*. In: modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification. A. Schots, F. M. Dewey and R. Oliver (Eds.). CAB International. Oxford, UK. 267 pp.
- Erselius, L.J., Vega-Sanchez, M. E. and Forbes, G. A. 2000. Stability in population of *Phytophthora infestans* attacking tomato in Ecuador demonstrated by cellulose acetate assessment of glucose-6-phosphate isomerase. Plant Dis. 84:325-327.
- Flier, W. G. 2001. Variation in *Phytophthora infestans*, sources and implications. PhD Thesis, Wageningen University. Netherlands. 206 pp.
- Flier, W. G., Turkensteen, L.J., and Mulder, A. 1991. Variation in tuber pathogenicity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. Potato Res. 41:345-354.

- Flores, O. A., Martínez, S. J. P. y Martínez, E. A. D. 1997. Uso de nuevas tecnologías en la detección y el análisis genético de fitopatógenos. *Fitopatología* 32:96-100.
- Fry, W.E., Drenth, A., Goodwin S. B., Matuszak J. M., Spielman L. J. and Milgroom, M.G. 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:107-129.
- Fry, W. E., Goodwin, S. B., Dyer, A. T., Matuszak, J. M., Drenth, A., Tooley, P. W., Sujkowski, L. S., Koh, Y. J., Cohen, A. B., Spielman, L. J., Deahl, K. L., Inglis, O. A. and Sandlan, K. P. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways and implications. *Plant Dis.* 77:653-661.
- Gallegly, M. E. and Galindo, J. A. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in Mexico. *Phytopathology* 48:274-277.
- Garay, S. E. 2001. Estructura genética de la población de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary en el Valle de Toluca, México. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Méx. 39 pp.
- Gebhardt, C. and Valkonen, J. P. T. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:79-102.

- Giddins, N. J. and Berg, A. 1919. A comparison of the late blight of tomato and potato. *Phytopathology* 9:209-210.
- Goodwin, B. S., Spielman, L. J., Matuszak, J. M., Bergeron, S. N. and Fry, W. E. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and Central Mexico. *Phytopathology* 82:955-961.
- Goodwin, B. S., Shneider, E. R. and Fry, W. E. 1995. Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of alloenzyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 79:1181-1185.
- Grünwald, N. J., Flier, W.G., Sturbaum, A. K., Garay, S. E., Van den Bosch, T. B.M., Smart, C. D., Matuszak, J. M., Lozoya, S. H., Turkensteen, L. J., and Fry, W. E. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca Valley Region of Central Mexico. *Phytopathology* 91:882-890.
- Gutiérrez, F. F. X. y Cadena H. M. A. 1996. Evaluation of horizontal resistance and effects of R-Genes in ten mexican cultivars against potato late blight (*Phytophthora infestans*) under natural conditions in the central plateau of Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14:97-102.
- Guzman-N, J. 1964. Nature of partial resistance of certain clones of three *Solanum* species to *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 54:1398-1404.

- Hebert, N. P. D. and Beaton, J. M. 1989. Methodologies for alloenzyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. A practical handbook. Helena Laboratories. Guelph, Ontario. 31 pp.
- Inglis, D.A., Johnson D.A., Legard, D. E., Fry, W. E. and Hamm, P.B. 1996. Relative resistance of potato clones in response to new and old population of *Phytophthora infestans*. Plant Dis. 80:575-578.
- Judelson, H. S. 1996. Genetic and physical variability at the mating type locus of the oomycete, *Pytophthora infestans*. Genetics 144:1005-1013.
- Kadish, D. and Cohen, Y. 1992. Overseasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers. Phytopathology 82:887-889.
- Latin, R. X., Mackenzie, D.R. and Cole H. 1981. The influence of host and pathogen genotypes on the apparent infection rates of potato late blight epidemics. Phytopathology 71:82-85.
- Leach, E.J., Vera, C.C.M., Bai, J., Leung, H. 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. Annu. Rev. Phytopathology. 39:187-224.

- Lozoya-Saldaña, H., Grünwald, N., Garay-Serrano, E., Sturbaum-Abud, A., and Brown, Ch. 2002. Population substructuring of *Phytophthora infestans* on American potato clones in the Toluca Valley, México. XXVI International Horticultural Congress, Toronto, Canada.
- Matuszak, J. M., Fernández, E. J., Gu, W. K., Villarreal, G. M., Fry, W. E. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. Plant Dis. 78:911-916.
- Miller, M. P. 1997. Toools for population genetic analysis (TPFGA). A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed., version 1.3. Northern Arizona University. Arizona, USA.
- Mizubuti, S. G. E. and Fry, W. E. 1998. Temperature effects on developmental stages of isolates from three clonal lineages of *Phytophthora infestans*. Phytopathology. 88:837-843.
- Oijen, M. V. 1992. Selection and use of a mathematical model to evaluate components of resistance to *Phytophthora infestans* in potato. Neth. J. Plant Pathol. 98:192-202.
- Parlevliet, J.E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. Annu. Rev. Phytopathology. 17:203-222.

Sozzi, D. and Staub, T. 1987. Accuracy of methods to monitor sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenilamide fungicides. Plant Dis. 71: 422-425.

Sujkowski, L. S., Fry, B. A., Power, R. J., Goodwin, S. B., Peever, T. L., Hamlen, R. A., and Fry, W. E. 1995. Sensitivities of Mexican isolates of *Phytophthora infestans* to chlorothalonil, cymoxanil and metalaxyl. Plant Dis. 79:1117-1120.

Tooley, P. W., Fry, W. E., and Villarreal, G. M. J. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. Journal of Heredity 76:431-435.

Tooley, P. W., Swigard, J.A. and Fry, W.E. 1986. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. Phytopathology 76:1209-1212.

Umaerus, V., Umaerus M., Erjefält and Nilsson B.A. 1995. Control of *Phytophthora* by host resistance: problems and progress. In: *Phytophthora* its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartnicki-García and P. H. Tsao (Eds.). APS. Third printing. St. Paul, Minnesota, USA. 392 pp.

Wastie, R. 1991. Breeding for resistance. In: *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. D. S. Ingram and P. H. Williams (Eds). Advances in plant pathology Vol. 7. Academic Press, London. 224 pp.

VII. APENDICE

Cuadro 1. Porcentajes de crecimiento de los aislamientos obtenidos en la variedad Rosita con metalaxil a 1, 10 y 100 µg/ml.

AISLAMIENTO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
PIC 00 H6-1	3.84	1.42	0
PIC 00 H6-2	12.31	11.64	2.67
PIC 00 H6-3	15.18	6.4	0
PIC 00 H6-4	74	36.87	10
PIC 00 H6-5	28.92	0	0
PIC 00 H6-6	63.43	17.8	2.36
PIC 00 H6-7	5.5	2.43	0
PIC 00 H6-8	7.41	0	0
PIC 00 H6-9	2.38	0	0
PIC 00 H6-10	5.28	0	0
PIC 00 H6-11	3.16	0	0
PIC 00 H6-12	9.32	8.47	5.08
PIC 00 H6-13	8.08	3.36	0
PIC 00 H6-14	4.44	3.71	1.48
PIC 00 H6-15	3.43	0	0
PIC 00 H6-16	23.48	2.76	1.38
PIC 00 H6-17	8.95	0	0
PIC 00 H6-18	15.16	3.52	0
PIC 00 H6-19	83.90	42.48	39.88
PIC 00 H6-20	5.30	2.12	0
PIC 00 H6-21	9.07	0	0

Cuadro 2. Porcentajes de crecimiento de los aislamientos obtenidos en la variedad Nortaña con metalaxil a 1, 10 y 100 µg/ml.

AISLAMIENTO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
PIC OO H7-1	84.66	84.66	57.6
PIC OO H7-2	41.53	4.61	4.61
PIC OO H7-3	1.77	0	0
PIC OO H7-4	42.64	21.05	8.77
PIC OO H7-5	27.80	13.16	0
PIC OO H7-6	14.10	6.52	5.62
PIC OO H7-7	64.82	29.98	1.68
PIC OO H7-8	37	12.8	0
PIC OO H7-9	-	-	-
PIC OO H7-10	37.76	5.20	0
PIC OO H7-11	67.25	35.1	30.92
PIC OO H7-12	9.28	2.85	0
PIC OO H7-13	32.46	3.18	0
PIC OO H7-14	42.33	15.0	1.16
PIC OO H7-15	83.38	42.37	30
PIC OO H7-16	29.94	23.95	20.95
PIC OO H7-17	24.42	0	0
PIC OO H7-18	12.82	7.69	0
PIC OO H7-19	3.37	1.35	1.35
PIC OO H7-20	-	-	-
PIC OO H7-21	3.0	2.8	2.3

Cuadro 3. Porcentajes de crecimiento de los aislamientos obtenidos en la variedad Alpha con metalaxil a 1, 10 y 100 µg/ml.

AISLAMIENTO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
PIC OO H8-1	10.23	7.08	4.72
PIC OO H8-2	40.81	15.1	4.05
PIC OO H8-3	11.56	8.27	5.53
PIC OO H8-4	17.68	6.59	0
PIC OO H8-5	31.94	13.64	10.07
PIC OO H8-6	51.88	45.54	9.9
PIC OO H8-7	44.64	1.27	0
PIC OO H8-8	12.13	1.21	1.21
PIC OO H8-9	13.9	13.0	0
PIC OO H8-10	44.48	6.18	0
PIC OO H8-11	-	-	-
PIC OO H8-12	20.08	0	0
PIC OO H8-13	31.17	16.61	9.49
PIC OO H8-14	21.52	11.8	4.16
PIC OO H8-15	94.24	71.20	45.81
PIC OO H8-16	25.84	3.69	1.47
PIC OO H8-17	34.05	0	0
PIC OO H8-18	12.71	0	0
PIC OO H8-19	12.77	0	0
PIC OO H8-20	-	-	-
PIC OO H8-21	99.06	22.42	15.88
PIC 00 H8-22	88.23	26.35	24.0
PIC 00 H8-23	19.18	8.78	0

Cuadro 4. Porcentajes de crecimiento de los aislamientos obtenidos en la variedad Monserrat con metalaxil a 1, 10 y 100 µg/ml.

AISLAMIENTO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
PIC 00 H10-1	18.14	12.22	4.93
PIC 00 H10-2	13.07	3.84	1.53
PIC 00 H10-3	4.65	2.79	2.32
PIC 00 H10-4	3.78	0	0
PIC 00 H10-5	46.72	12.18	2.18
PIC 00 H10-6	5.45	0	0
PIC 00 H10-7	12.62	4.27	1.94
PIC 00 H10-8	8.81	1.69	0.84
PIC 00 H10-9	7.70	0.81	0
PIC 00 H10-10	12.99	4.67	0
PIC 00 H10-12	97.39	77.39	49.56

Cuadro 5. Porcentajes de crecimiento de los aislamientos obtenidos en la variedad Michoacán con metalaxil a 1, 10 y 100 µg/ml.

AISLAMIENTO	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
PIC OO H11-1	94.79	38.95	16.04
PIC OO H11-2	89.09	83.85	34.59
PIC OO H11-3	90.03	39.85	14.57
PIC OO H11-4	84.79	49.82	13.11
PIC OO H11-5	88.88	55.55	9.87
PIC OO H11-6	86.88	33.21	8.21
PIC OO H11-7	86.65	51.06	36.47
PIC OO H11-8	69.47	21.0	7.54
PIC OO H11-9	32.36	13.79	5.83
PIC OO H11-10	31.81	7.08	3.14
PIC OO H11-11	91.30	60.34	27.82
PIC OO H11-12	100	74.11	35.39
PIC OO H11-13	88.75	34.91	6.31
PIC OO H11-14	99.43	30.84	13.08
PIC OO H11-15	75.47	22.61	21.42
PIC OO H11-16	78.87	35.51	12.14
PIC OO H11-17	78.87	26.73	6.50
PIC OO H11-18	89.32	41.06	3.08
PIC OO H11-19	27.96	6.77	2.11
PIC OO H11-20	98.78	61.16	27.91
PIC OO H11-21	28.98	0	0
PIC OO H11-22	87.64	83.06	54.18
PIC OO H11-23	88.34	41.73	9.95
PIC OO H11-24	75.78	69.19	46.12

Distancias genéticas

Análisis UPGMA usando la distancia original de Roger (1972), de los aislamientos obtenidos de Rosita, Norteña, Alpha, Monserrat y Michoacán.

Punto Distancias genéticas

- 1 0.0718 Intersección Rosita-Norteña
- 2 0.0735 Intersección Alpha-Monserrat
- 3 0.1181 Intersección Rosita-Norteña-Alpha-Monserrat
- 4 0.1339 Intersección de todas las anteriores con Michoacán

Distancias de identidades de los aislamientos obtenidos de Rosita, Norteña, Alpha, Monserrat y Michoacán en base a la prueba de NEI'S (1972/1978)

Poblaciones

Comparaciones	identidad
Rosita vs. Norteña	0.9890
Rosita vs. Alpha	0.9701
Rosita vs. Monserrat	0.9638
Rosita vs. Michoacán	0.9506
Norteña vs. Alpha	0.9830
Norteña vs. Monserrat	0.9776
Norteña vs. Michoacán	0.9583

Alpha vs. Monserrat 0.9931

Alpha vs. Michoacán 0.9588

Monserrat vs. Michoacán 0.9685

Preparación del medio centeno-agar

A. Preparación de un litro de concentrado de centeno

1. Pesar 600 gr de centeno.
2. Desinfectar por 10 min en 1 l de cloro al 2%.
3. Enjuagar el centeno hasta quitar el olor a cloro.
4. Agregar 500 ml de agua.
5. Tapar con papel aluminio y dejar reposar de 36 a 48 hr.
6. Lavar semillas germinadas dos veces.
7. Licuarlas en un litro de agua.
8. Vaciar la mezcla en dos matraces de 2 L y taparlos con papel aluminio.
9. Incubar en horno a 50 °C por 3 hr.
10. Colar la mezcla con manta de cielo.
11. Separar alícuotas de 100 ml de concentrado (si no se utiliza en el momento guardar al congelador hasta utilizarse)

B. Preparación de un litro de centeno-agar.

1. Mezclar en un recipiente (matraz, botella, etc.) 900 ml de agua, 100 ml de concentrado de centeno, 20 gr de azúcar, 15 gr de agar.
2. Esterilizar la mezcla.
3. Vaciar en cajas petri cuando la temperatura del medio sea de aproximadamente 45°C.

BIBLIOTECA CENTRAL U. A. CH.