

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**CARACTERIZACIÓN DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary EN
ESPECIES SILVESTRES DE *Solanum* EN EL VALLE DE TOLUCA,
MÉXICO.**

TESIS

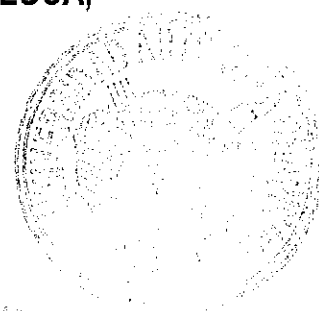
**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL.

PRESENTA:

DANIEL PERALES ROSAS

CHAPINGO, MÉXICO, JUNIO DEL 2003



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
DEPTO. DE ENTOMOLOGÍA Y FITOPATÍA
ORIGINAL DEPENDIENTE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN

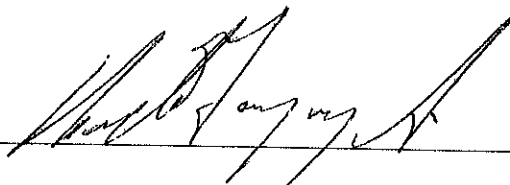


**CARACTERIZACIÓN DE *Phytophthora infestans* (Mont.) DE BARY EN
ESPECIES SILVESTRES DE *Solanum* EN EL VALLE DE TOLUCA, MÉXICO.**

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

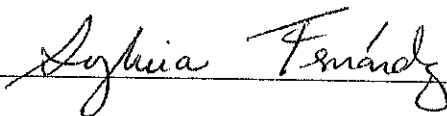
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTOR:



Ph. D. HECTOR LOZOYA SALDAÑA

ASESOR:



Ph. D. SYLVIA PATRICIA FERNANDEZ PAVÍA

ASESOR:



DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

DEDICATORIA

A Dios por permitirme vivir, cuidarme y darme sabiduría para enfrentar la vida.

A mis padres: **Sr. Ángel Perales Ramírez** y **Sra. Belén Rosas Briceño** por la confianza y apoyo brindado en todo lo que emprendo.....Gracias, que Dios me los cuide.

A mis hermanos: **Carlos, Lucía, Francisco, Miguel Ángel, Arnulfo y Jorge Alberto**, por ser los mejores hermanos y amigos del mundo.....que Dios los bendiga.

A mis sobrinitos: **Jhoseline, Sarita y Ángel** por ser una bendición de Dios en mi familia, que con su inocencia me hacen sonreír a la vida.

A mis **cuñados**: Gloria Elena y Bernardo, por formar parte de esta bonita familia.

A la familia Espinosa Sandoval, por su confianza y amistad brindada, en especial a Kevinchoncho.....Gracias, que Dios los cuide.

A mis amigos.....que siempre están presentes en los momentos más difíciles de la vida.

A todos mis compañeros de la maestría.

Con cariño.....Daniel.

AGRADECIMIENTOS

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

A la Universidad Autónoma Chapingo y en especial al Departamento de Parasitología Agrícola por la formación humana y profesional que siempre me han brindado....espero algún día poder corresponder.

A todos los profesores que integran el Programa en Protección Vegetal por compartir sus conocimientos y experiencias.....siempre serán un ejemplo a seguir.

Al PICTIPAPA por el apoyo recibido para realizar esta tesis.

Al Ph. D. Héctor Lozoya Saldaña por la excelente dirección de la tesis, confianza y enseñanza en la investigación.

Al Ph. D. Nahúm Marbán Mendoza por su amistad y confianza brindada en toda mi estancia en la maestría.

Al Dr. Cecilio Mendoza Zamora (qepd) por el cariño que siempre tuvo al Departamento de Parasitología Agrícola, por su legado científico en la fitosanidad mexicana y porque siempre vio en nosotros el presente inmediato de Parasitología Agrícola en México.

A la Ph. D. Sylvia Fernández Pavía, por las atinadas observaciones realizadas en el presente trabajo.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por su confianza, tiempo y dedicación brindada en la realización de este trabajo.

A todo el personal del PICTIPAPA por su amistad y ayuda brindada en la realización de la presente investigación.

DATOS BIOGRAFICOS

DANIEL PERALES ROSAS NACIO EN EJIDO CANOAS, MUNICIPIO DE CIUDAD VALLES, SAN LUIS POTOSÍ EL 12 DE ABRIL DE 1977, DONDE CURSO SUS ESTUDIOS DE EDUCACIÓN PRIMARIA EN LA ESCUELA “ALFREDO V. BONFIL” DE ESA MISMA LOCALIDAD, LA EDUCACIÓN SECUNDARIA LA REALIZO EN LA TELESECUNDARIA “PLAN DE SAN LUIS” UBICADA EN EL INGENIO PLAN DE SAN LUIS. EN 1993 INGRESO A LA PREPARATORIA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO DONDE SE DISTINGUIÓ COMO UN ALUMNO DE EXCELENCIA Y SER CONSIDERADO COMO CUADRO DE HONOR, MENCIÓN QUE OTORGA DICHA UNIVERSIDAD A LOS ALUMNOS MAS DESTACADOS. EN 1996 INGRESO AL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRÍCOLA, DONDE SE GRADUO EN EL AÑO 2000 CON MENCIÓN HONORÍFICA, SIENDO ADEMÁS RECONOCIDO COMO ALUMNO CUADRO DE HONOR DE DICHA UNIVERSIDAD.

EN EL AÑO 2001 INGRESO A LA MAESTRIA EN PROTECCIÓN VEGETAL DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO, DONDE EGRESO EN DICIEMBRE DEL 2002.

HA PARTICIPADO EN DIFERENTES EVENTOS CIENTÍFICOS NACIONALES E INTERNACIONALES, COMO ASISTENTE O PONENTE, SOBRESALIENDO COMO PONENTE EL IV SEMINARIO CIENTÍFICO INTERNACIONAL DE SANIDAD VEGETAL CON SEDE EN VARADERO, CUBA. HA TRABAJADO COMO ASESOR TÉCNICO DE PRODUCTORES CAÑEROS EN CIUDAD VALLES, SAN LUIS POTOSÍ, ADEMÁS DE ESTAR APROBADO POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL PARA VERIFICAR LA CAMPAÑA DE MOSCAS DE LA FRUTA.

CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE APÉNDICE	xii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Centro de origen y diversificación de <i>Solanum tuberosum</i> L.	3
2.1.1. Especies silvestres de <i>Solanum</i>	3
2.2. Del patógeno <i>P. infestans</i>	4
2.2.1. Importancia mundial	4
2.2.2. Clasificación taxonómica	5
2.2.3. Características morfológicas y ciclo de vida	6
2.2.4. Centro de origen de <i>P. infestans</i>	6
2.2.5. Caracterización de poblaciones	8
2.2.5.1. Grupos de compatibilidad	10
2.2.5.2. Razas fisiológicas	11
2.2.5.3. Resistencia a metalaxil	12
2.2.6. Marcadores moleculares	13

2.2.6.1. Isoenzimas	14
2.2.6.2. Estudios de isoenzimas en <i>P. infestans</i>	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1. Material biológico	17
3.2. Progreso de la enfermedad	18
3.3. Preparación del medio centeno agar	18
3.4. Preparación del concentrado de centeno	18
3.5. Determinación del grupo de compatibilidad	19
3.6. Análisis isoenzimático	19
3.6.1. Preparación del tejido miceliar	20
3.6.2. Preparación de placas de acetato de celulosa y amortiguador	20
3.6.3. Electroforesis	20
3.6.4. Tinción	21
3.7. Respuesta a metalaxil	21
3.8. Análisis de distancias genéticas	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Severidad de la enfermedad en las especies evaluadas	23
4.1.1. <i>Solanum phureja</i>	23
4.1.2. <i>Solanum acaule</i>	24
4.1.3. <i>Solanum bulbocastanum</i> , <i>Solanum caripense</i> , <i>Solanum andreanum</i> y <i>Solanum muricatum</i>	25
4.2. Grupo de Compatibilidad (G.C.) y perfil isoenzimático	26

4.2.1. Grupo de Compatibilidad (G.C.) y perfil isoenzimático por especie de hospedantes	28
4.2.1.1. <i>Solanum phureja</i>	28
4.2.1.2. <i>Solanum acaule</i>	30
4.2.1.3. <i>Solanum bulbocastanum</i>	31
4.2.1.4. <i>Solanum caripense</i>	31
4.2.1.5. <i>Solanum muricatum</i>	32
4.2.1.6. <i>Solanum andreanum</i>	33
4.3. Resistencia a metalaxil de la población en estudio	33
4.3.1. Resistencia a metalaxil por especies silvestres de <i>Solanum</i>	34
4.3.1.1. <i>Solanum phureja</i>	35
4.3.1.2. <i>Solanum acaule</i>	36
4.3.1.3. <i>Solanum bulbocastanum</i>	36
4.3.1.4. <i>Solanum caripense</i>	37
4.3.1.5. <i>Solanum muricatum</i>	38
4.3.2. Respuesta a metalaxil a 10 µg mL ⁻¹	39
4.3.2.1. General	39
4.3.2.2. Por especie	40
4.3.3. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C) y respuesta a metalaxil a 10 µg mL ⁻¹	41

4.3.3.1. Relación entre el Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta	
a metalaxil a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por especie silvestre	43
4.3.3.1.1. <i>Solanum phureja</i>	43
4.3.3.1.2. <i>Solanum acaule</i>	44
4.3.3.1.3. <i>Solanum caripense</i>	45
4.4. Agrupamiento genético	47
4.5. Discusión general	48
V. CONCLUSIONES	52
VI. LITERATURA CITADA	53
VII. APÉNDICE	62

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Especies de <i>Solanum</i> , número de aislamientos utilizados y origen de la especie.....	17
Cuadro 2. Frecuencias de genotipos de <i>P. infestans</i> aislados de 6 especies silvestres de <i>Solanum</i> . Toluca, México, 2000.....	27
Cuadro 3. Frecuencias de genotipos de <i>P. infestans</i> aislados de <i>S. phureja</i> . Toluca, México, 2000.....	29
Cuadro 4. Frecuencias de genotipos de <i>P. infestans</i> aislados de <i>S. acaule</i> . Toluca, México, 2000.....	30
Cuadro 5. Frecuencias de genotipos de <i>P. infestans</i> aislados de <i>S. bulbocastanum</i> . Toluca, México, 2000.....	31
Cuadro 6. Frecuencias de genotipos de <i>P. infestans</i> aislados de <i>S. caripense</i> . Toluca, México, 2000.....	32
Cuadro 7. Frecuencias de genotipos de <i>P. infestans</i> aislados de <i>S. muricatum</i> . Toluca, México, 2000.....	32
Cuadro 8. Frecuencias de genotipos de <i>P. infestans</i> aislados de <i>S. andreamum</i> . Toluca, México, 2000.....	33

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Respuesta de cinco clones de <i>S. phureja</i> al ataque de <i>P. infestans</i> en el Valle de Toluca, México.....	23
Figura 2. Respuesta de tres clones de <i>S. acaule</i> al ataque de <i>P. infestans</i> en el Valle de Toluca, México.....	24
Figura 3. Respuesta de <i>S. caripense</i> , <i>S. bulbocatanum</i> , <i>S. andreanum</i> y <i>S. muricatum</i> al ataque de <i>P. infestans</i> en el Valle de Toluca, México.....	25
Figura 4. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimientos relativos de la población de <i>P. infestans</i> obtenida de especies silvestres de <i>Solanum</i>	34
Figura 5. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de <i>Solanum phureja</i>	35
Figura 6. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de <i>Solanum acaule</i>	36
Figura 7. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de <i>Solanum bulbocastanum</i>	37
Figura 8. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de <i>Solanum caripense</i>	38
Figura 9. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de <i>Solanum muricatum</i>	39

Figura 10.	Respuesta a metalaxil de la población de <i>P. infestans</i> obtenida de especies silvestres de <i>Solanum</i> a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).....	40
Figura 11.	Distribución de la respuesta a metalaxil de especies silvestres a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).....	41
Figura 12.	Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).....	42
Figura 13.	Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de <i>Solanum phureja</i> . MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).....	44
Figura 14.	Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de <i>Solanum acaule</i> . MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).....	45

Figura 15. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de <i>Solanum caripense</i> . MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).....	46
Figura 16. Dendograma basado en el análisis UPGMA de la población de <i>P. infestans</i> aisladas de <i>S. phureja</i> (1), <i>S. acaule</i> (2), <i>S. bulbocastanum</i> (3), <i>S. andreanum</i> (4), <i>S. caripense</i> (5) y <i>S. muricatum</i> (6).....	48

LISTA DE APÉNDICE

	Pag.
Cuadro 1. Frecuencia de los alelos de glucosa-fosfato-isomerasa (<i>Gpi</i>) y peptidasa (<i>Pep</i>) por localidad y año de colección (Fry <i>et al.</i> , 1992)	62
Cuadro 2. Características de los genotipos norteamericanos usados como referencias en la determinación de los alelos para las isoenzimas <i>Pep</i> y <i>Gpi</i> (Goodwin <i>et al.</i> , 1995)	62
Cuadro 3. Reactivos utilizados en la tinción de <i>Gpi</i>	63
Cuadro 4. Reactivos utilizados en la tinción de <i>Pep</i>	63
Cuadro 5. Análisis UPGMA usando las distancias originales de Nei's (1972), de los aislamientos de <i>S. phureja</i> , <i>S. acaule</i> , <i>S. bulbocastanum</i> , <i>S. andreanum</i> , <i>S. caripense</i> y <i>S. muricatum</i>	68
Cuadro 6. Distancia de identidad de los aislamientos obtenidos de <i>S. phureja</i> , <i>S. acaule</i> , <i>S. bulbocastanum</i> , <i>S. andreanum</i> , <i>S. caripense</i> y <i>S. muricatum</i> , en base a la prueba de Nei's (1972/1978)	68
Figura 1. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de <i>Solanum andreanum</i>	64

Figura 2.	Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de <i>Solanum muricatum</i> . MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil)	65
Figura 3.	Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de <i>Solanum bulbocastanum</i> . MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil)	66
Figura 4.	Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de <i>Solanum andreaeanum</i> . MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil)	67

RESUMEN

A fin de determinar posible especificidad hospedante-patógeno, en el verano del 2000 se obtuvieron aislamientos de infecciones naturales de *P. infestans* (*P.i.*) de seis especies silvestres de *Solanum* en el valle de Toluca. Los aislamientos se caracterizaron mediante determinación del grupo de compatibilidad (G.C.), sensibilidad al metalaxil y presencia de las enzimas *glucosa-6-fosfato isomerasa* (*Gpi*) y *peptidasa* (*Pep*). También se registró la severidad de la enfermedad en cada una de las especies de *Solanum*. *S. phureja* y *S. acaule* mostraron diversos grados de severidad de la enfermedad entre individuos de cada población. El resto de las especies fueron resistentes al patógeno. De 24 aislamientos de *S. phureja* se obtuvieron 13 genotipos multiloci, sobresaliendo el genotipo A2 100/100 *Gpi* y 100/100 *Pep*, con una frecuencia de 22% y la proporción A1:A2 fue de 0.6:1. Se encontraron nueve genotipos multiloci de la población de *P.i.* obtenida de *S. acaule*, de los cuales también el 22 % fue A2, 100/100 *Gpi* y 100/100 *Pep*, con una proporción G.C. 1:1. En *S. bulbocastanum* no sobresalió algún genotipo en especial y el único G.C. fue A1. En *S. caripense* tampoco predominó algún genotipo y la proporción de G.C. A1:A2 fue de 0.25:1. En *S. muricatum* el único genotipo presente fue A1 86/100, 92/100 (*Gpi*, *Pep*), correspondiente al US-1, y los dos aislamientos de *S. andreaum* aquí incluidos fueron A1, 86/100 *Gpi* y 100/100 *Pep*. *S. phureja* y *S. acaule* fueron las especies con mayor frecuencia de aislamientos altamente resistentes a metalaxil (MHR) y en menor proporción los de *S. caripense* y *S. muricatum*. Los aislamientos de *S. bulbocastanum* y *S. andreaum*, ambas resistentes a *P. i.*, fueron A1 y susceptibles a metalaxil, considerándose como potenciales fuentes de resistencia contra el oomiceto. Todos los aislamientos homotáticos fueron altamente resistentes a metalaxil (MHR), y con excepción de *S. muricatum*, no se observó especificidad hospedero-patógeno.

Palabras clave: Grupo de compatibilidad, isoenzimas, metalaxil, *Solanum* spp, *P. infestans*.

SUMMARY

In order to determine potential host-pathogen interactions, in the summer of 2000 *P. infestans* (*P.i.*) isolates were obtained from natural infections on six wild *Solanum* species in the Toluca Valley. The isolates were characterized on their mating type (MT), metalaxil resistance, and the presence of the enzymes *Glucose-6-phosphate isomerase* (*GPI*) and *Peptidase* (*Pep*). Disease severity in every *Solanum* species was also assessed. *S. phureja* and *S. acaule* displayed diverse levels of disease severity among individuals of each population. The rest of the species were resistant to the pathogen. Thirteen multiloci genotypes were identified out of 24 isolates from *S. phureja*. The most frequent one (22%) was A2, 100/100 *Gpi*, 100/100 *Pep*, with a 0.6:1 A1:A2 ratio. Nine genotypes were present in the *P.i.* population obtained from *S. acaule*, and the most common one (22%) was also A2, 100/100 *Gpi*, 100/100 *Pep*, with a 1:1 A1:A2 ratio. No particular genotype from *S. bulbocastanum* was observed, and the only MT was A1. No predominant *P.i.* was present in the population from *S. caripense* either, and the MT ratio was 0.25:1. The only genotype from *S. muricatum* was A1, 86/100, 92/100 (*Gpi*, *Pep*), which coincides with US-1. The two isolates from *S. andreaeanum* included in this study were A1, 86/199 *Gpi*, 100/100 *Pep*. Isolates from *S. phureja* and *S. acaule* were the most metalaxil-resistant (MHR), followed by those from *S. caripense* and *S. muricatum*. The isolates from *S. bulbocastanum* and *S. andreaeanum*, both of them resistant to *P.i.*, were A1 and susceptible to metalaxil, which is considered a potential source of resistance against the oomycete. All the homothallic isolates were highly resistant to metalaxil (MHR), and with the exception of *S. muricatum*, no host-pathogen specificity was observed.

Key words: Mating type, isoenzymes, metalaxil, *Solanum* spp., *P. infestans*.

I. INTRODUCCIÓN

Phytophthora infestans, el patógeno causante de la enfermedad del tizón tardío de la papa y tomate, apareció por primera vez en la década de 1840 en Estados Unidos y Europa; ocasionado en 1845 hambruna en Irlanda, siendo desde entonces la principal enfermedad de la papa en el mundo, encontrándose principalmente en aquellas áreas de climas fríos y húmedos (Romero, 1993; Abad y Abad, 1997).

Este oomiceto es una especie heterotática que se ha propuesto como originaria del Valle de Toluca, México (Gallegly y Galindo, 1958; Goodwin, 1996); que en años recientes ha recobrado importancia por el resurgimiento de epidemias devastadoras alrededor del mundo, como consecuencia de la aparición de razas mas agresivas por la presencia del grupo de compatibilidad A2 fuera del Valle de Toluca (Spielman *et al.*, 1991; Fry *et al.*, 1992), algunas de las cuales presentan resistencia a metalaxil (Davidse *et al.*, 1983). Este hecho, aunado a las restricciones actuales del control químico en Europa y Estados Unidos (Gullino y Kuijpers., 1994; Ragsdale y Sisler., 1994), representan una amenaza para la producción nacional y mundial de papa, acelerando la búsqueda de resistencia genética durable, utilizando para ello plantas silvestres de *Solanum* con resistencia parcial a *P. infestans* para generar nuevas variedades con dicha característica.

El Valle de Toluca esta considerado como un centro secundario de origen del género *Solanum* que ha coevolucionado con el patógeno, viviendo en equilibrio, generando genes de resistencia, de tal manera que ambos completan sus ciclos de vida sin mayor daño para el hospedante (Niederhauser, 1991).

Actualmente se han realizado algunos estudios que caracterizan la estructura poblacional del oomiceto en el Valle de Toluca y que explican la dinámica actual del patógeno en diversos ambientes (Grünwald *et al.*, 2001; Garay-Serrano, 2001; Flier *et al.*, 2003). No obstante, no se encontraron estudios específicos que relacionaran la caracterización del patógeno con diversas especies de hospedantes, aunque si hay reportes sobre especificidad patogénica (Erselius *et al.*, 2000).

Con base a los aspectos anteriores, se planteo el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- 1.- Identificar si la resistencia genética contra *P. infestans* reportada fuera de México en especies de *Solanum* sudamericanas se conservan en el Valle de Toluca.
- 2.- Identificar posibles relaciones entre parámetros de patógenos y la especie de hospedante.
- 3.- Identificar el origen de la población (sexual, asexual) de *P. infestans* con base a la caracterización poblacional de aislamientos obtenidos de especies silvestres de *Solanum* en el Valle de Toluca.
- 4.- Describir a las cepas estudiadas en función de su grupo de compatibilidad, perfiles isoenzimáticos y resistencia a metalaxil.
- 5.- Determinar las mejores fuentes de resistencia genética entre las especies silvestres de *Solanum* incluidas en el presente estudio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Centro de origen y diversificación de *Solanum tuberosum* L.

El centro de origen de la papa cultivada se ubica en la cordillera de los Andes Sudamericanos, al sur de Perú y norte de Bolivia (López, 1991; Hawkes, 1994); sin embargo el norte de Chile, Venezuela, América Central, México y suroeste de Estados Unidos son considerados sitios de diversificación del género *Solanum*; sobresaliendo la región central de México, considerada como centro secundario de origen de la papa por la enorme diversidad de especies silvestres que en él se encuentran (Spire y Rousselle, 1999).

2.1.1. Especies silvestres de *Solanum*.

El género *Solanum* agrupa alrededor de 2000 especies, de las cuales 8 son cultivadas y aproximadamente 160 producen tubérculo (López, 1991).

La mayor diversidad de especies de *Solanum* se encuentra en la región Andina, donde se han extraído genes resistentes a *P. infestans* de especies como *S. andigenum*, *S. phureja*, *S. chiquidenum*, *S. piurea*, *S. irosinum* y *S. andeanum*. Sin embargo las especies silvestres de *Solanum* del centro de México manifiestan una mayor resistencia horizontal al tizón tardío como consecuencia de la coevolución del hospedante a una alta presión de selección del patógeno; de tal forma que *Solanum demissum* ha sido ampliamente utilizada en los programas de mejoramiento genético y sus genes se encuentran en más

del 50 % de los cultivares de papa resistentes al tizón en el mundo. *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. pinatisectum* y *S. iopetalum* son algunas especies mexicanas con genes de resistencia al tizón tardío (Flores, 1969; Niederhauser, 1991; Goodwin, 1996).

2.2. Del patógeno *P. infestans*

2.2.1. Importancia mundial

Desde su aparición en la década de 1840, *P. infestans* se ha convertido en el principal problema fitosanitario que mas ha influido en la historia del hombre, por su enorme agresividad y efectos devastadores en el cultivo de la papa, provocando la migración y muerte de pueblos enteros (Niederhauser, 1956).

Debido a la importancia que representa el cultivo de la papa en muchos países y el surgimiento de razas más agresivas del patógeno, ha provocado que en los últimos años los científicos del mundo unifiquen sus esfuerzos en nuevas líneas de investigación tendientes a controlarlo. Tan solo en Estados Unidos las pérdidas que ocasionó en 1994 fueron de 200 millones de dólares (Goodwin, 1997).

Fry *et al.* (1992) demostraron como la gran variabilidad del oomiceto ha generado cambios en su estructura poblacional alrededor del mundo, como consecuencia de la aparición del grupo de compatibilidad A2 fuera de México (Cuadro 1 del apéndice).

2.2.2. Clasificación taxonómica.

El nombre de *Phytophthora infestans* (del Griego *phyton* = planta, *phtheiros* = destructor) fue propuesto por Antón de Bary en 1876 al patógeno que ocasiona, a nivel mundial, el tizón tardío de la papa y tomate (Agrios, 1985; Romero, 1993).

Por muchos años este patógeno fue considerado como un hongo en las diferentes clasificaciones de estos organismos, como en las realizadas por Alexopoulos y Mims (1979) o la de G. W. Martín., 1961, citado por Romero, (1993) quien ubica a este hongo dentro de la Subdivisión Eumycotina; Clase Phycomycetes; Subclase Oomycetidae; Orden Peronosporales; Familia Pythiaceae.

Sin embargo este organismo está más relacionado a las algas cafés y diatomeas que a los hongos, por ser semi-acuáticos y presentar zoosporas con flagelos para su movilidad en medios acuáticos. Dick (1990), citado por Erwin y Ribeiro (1996), sitúa a *P. infestans* dentro del Reino Chromista; Phylum Oomycota; Clase Oomycetae; Subclase Peronosporomycetidae; Orden Pythiales; Familia Pythiaceae; Género *Phytophthora* y Especie *infestans*. En los últimos años *P. infestans* está siendo ubicada taxonómicamente en el Reino Stramenopila y Phylum Oomycota (Patterson y Sogin, 2000).

2.2.3. Características morfológicas y ciclo de vida.

P. infestans es un patógeno que se reproduce sexual y asexualmente, es un organismo heterotático, que presenta soma filamentoso con paredes miceliares cenocíticas compuestas de celulosa y glucanos. El micelio produce esporangioforos ramificados en simpodio compuesto, con hinchamientos en las ramas terminales donde nacen los esporangios de crecimiento indeterminado, de forma oval a elíptica, con papila inconspicua y decidua. La reproducción sexual se da por contacto de gametangios, oogonio y anteridio, formando oosporas lisas de paredes gruesas, apeleróticas. Los esporangios pueden germinar de manera directa o indirecta, dependiendo de la temperatura, liberando zoosporas biflageladas (Romero, 1993; Agrios, 1998).

El patógeno sobrevive de un año a otro en forma de micelio en tubérculos de papa o bien en otras especies hospederas cultivadas o silvestres. El inóculo puede estar en el suelo en forma de oospora o bien ser trasportadas las zoospora y oosporas por el agua. Las oosporas tienen la capacidad de soportar las condiciones ambientales adversas y permanecer viables (Erwin y Ribeiro, 1996; Agrios, 1998).

2.2.4. Centro de origen de *P. infestans*.

Cuando Reddick (1939), Niederhauser (1956) y Gallegly y Galindo (1958) aportaron evidencias fuertes sobre el origen mexicano de *P. infestans*, esta teoría fue aceptada mundialmente; sin embargo en los últimos años otras corrientes de pensamiento han cuestionado esta teoría y proponen como centro de origen de *P. ifestans* a la región de

los Andes Sudamericanos, centro de origen del cultivo (Abad y Abad, 1997; Abad *et al*, 1995).

Las evidencias aportadas que tratan de demostrar el origen Andino de este oomiceto se basan en reportes de literatura antigua que hacen referencias vagas sobre términos y síntomas similares con los que hoy se han identificado a *P. infestans*. Abad y Abad (1997) también mencionan que Berkeley y Anton de Bary (1845-1846) sugieren que *P. infestans* fue importada a Europa de los Andes Sudamericanos.

Ristaino *et al.* (2001) apoyando la teoría del origen Sudamericano de *P. infestans* trabajó con ADN mitocondrial (*mt*) del oomiceto de muestras de herbarios de 1847-1948 y los comparó con aislamientos recientes de Estados Unidos, Europa, Brasil, Ecuador y México. Encontró en los aislamientos recientes los haplotipos Ia, Ib, IIa, IIb de ADN *mt*, sin embargo ninguno correspondía con las secuencias encontradas en las muestras de herbarios. Las muestras mexicanas contaban con los haplotipos Ia, IIa, IIb, pero no con el haplotipo Ib que sí está presente en los otros países; por lo que sugiere que México es un centro de diversidad de *P. infestans* pero no centro de origen de patógeno, pudiéndose encontrar este en Sudamérica.

La teoría que propone a México como centro de origen de *P. infestans* ha sido sustentada por Goodwin (1996), quien ha recopilado una serie de evidencias históricas, biológicas y genéticas que así lo demuestran. De acuerdo con este autor, antes de 1840 no existía una disciplina científica de Fitopatología que pudiera diagnosticar una enfermedad, haciendo alusión a Abad y Abad (1995) menciona que estos argumentos

son solo palabras que describen el estado de muerte del cultivo de la papa que pudo ser causado por otros agentes. Argumentando además que el primer reporte de *P. infestans* en Sudamérica fue en 1887 en Argentina.

Las evidencias biológicas que respaldan la teoría del origen del oomiceto en el altiplano central de México son los genes de resistencia que tienen las especies silvestres de *Solanum* de México, ausentes en otros lugares, la alta virulencia del patógeno, el descubrimiento del grupo de compatibilidad A2 en los valles altos de México y la continua proporción 1:1 de A1 y A2. Las evidencias genéticas son: i) la cercanía genética entre *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. ipomoea* (Flier *et al.*, 2002), estas dos últimas no reportadas fuera de México, que hace suponer un ancestro común, ii) la alta diversidad genética que ocurre de manera natural en México, iii) las poblaciones de otros países contenían hasta antes de 1980 solo la línea clonal A1.

2.2.5. Caracterización de las poblaciones.

Considerando a una población como a un conjunto de individuos con ciertas características similares, la homogeneidad y el tamaño de la población estarán en función al tipo de características seleccionada. En el caso de *P. infestans*, la relación hospedero-patógeno fue la primera característica que significativamente contribuyó a caracterizar las poblaciones. En este sentido, la reacción de plantas diferenciales de *Solanum demissum* ante la infección por aislamientos del oomiceto, se han usado para identificar las razas fisiológicas de *P. infestans* (Black *et al.*, 1953; citado por Romero, 1993).

Las técnicas bioquímicas han ayudado a caracterizar genéticamente a *P. infestans* . Usando electroforesis en acetato de celulosa se ha encontrado polimorfismo en 13 isoenzimas, de las cuales dos, *glucosa-fosfato-isomerasa (Gpi)* y *peptidasa (Pep)*, han sido usadas como marcadores genéticos para identificar genotipos y caracterizar las poblaciones del patógeno (Goodwin *et al.*, 1995 b).

Simultáneamente, el tipo de apareamiento en base a la característica heterotática del oomiceto y la sensibilidad al fungicida metalaxil, han sido usados como métodos para la caracterización poblacional del patógeno (Gallegly y Galindo, 1958; Kadish *et al.*, 1990; Grünwald *et al.*, 2001).

Las técnicas moleculares son también usadas ahora para caracterizar las poblaciones de *P. infestans*, basándose en el polimorfismo del ADN de las mitocondrias (haplotipos) y del núcleo (Griffith y Shaw, 1998., Ristaino *et al.*, 2001). Estas técnicas están ayudando a estudiar la recombinación genética y las migraciones del patógeno. En la actualidad, los estudios de caracterización de las poblaciones de *P. infestans* incluyen la combinación de los métodos de determinación del tipo de apareamiento, sensibilidad al metalaxil, isoenzimas, marcadores genéticos del ADN del núcleo y haplotipos mitocondriales (Grünwald *et al.*, 2001). Todas ellas contribuyen a conocer al patógeno y entender su dinámica, para de esta manera poder diseñar estrategias que permitan tener un mejor control de la enfermedad.

2.2.5.1. Grupos de compatibilidad.

Este oomiceto es una especie heterotálica, que requiere de la aproximación física de dos hifas de grupo de compatibilidad diferente (A1 y A2) para que ocurra la oosporogenesis (Smart *et al.*, 2000). Este fenómeno de heterotalismo fue comprobado por Smoot *et al.* (1958), quien apareó 109 aislamientos de diversos países entre los que se encontraba México y observó que tres aislamientos mexicanos formaban oosporas abundantes con todos los aislamientos extranjeros y uno de México, demostrando así que sólo en México existían los dos grupos de compatibilidad. Estos resultados fueron corroborados por Gallegly y Galindo (1958) quienes encontraron una proporción 1:1 en aislamientos procedentes del Valle de Toluca y Chapingo, México, llamando grupo de compatibilidad A1 al cosmopolita y A2 al exclusivo de México.

Spielman *et al.* (1991) observando los grupos de compatibilidad y el polimorfismo de las isoenzimas postularon que los cambios en la estructura poblacional de *P. infestans* en Europa, podrían agruparse en pre-A2 o poblaciones viejas con solo el grupo de compatibilidad A1; y en post-A2 o poblaciones nuevas, con ambos grupos de compatibilidad, observando que las poblaciones nuevas son mas agresivas que las poblaciones viejas. Trabajos recientes revelan que el grupo de compatibilidad A2 tiene la capacidad de auto fertilizarse y producir oosporas en periodos cortos de tiempo cuando son crecidos en una mezcla 50:50 de medios V8 y centeno, cosa que no ocurre en la mayoría de los aislamientos A1 (Romero, 1958; Smart *et al.*, 2000).

La inestabilidad del patógeno es otra de las fuentes para la generación de razas fisiológicas; Romero (1958) demostró que a partir de cepas homotáticas obtenidas de cultivos monozosporicos era posible tener aislamientos A1, A2 y homotáticos; los aislamientos A1 permanecían constantes al menos hasta la tercera generación, en tanto que los A2 podían dar origen a cepas A2 y homotáticos.

En la actualidad las poblaciones “nuevas” de *P. infestans* están desplazando a poblaciones “viejas” alrededor del mundo. Esto ha generado que las nuevas razas, más agresivas, tengan la capacidad de destruir las variedades resistentes (Gisi y Cohen, 1996), provocando la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia horizontal a *P. infestans* en México y Perú (Niederhauser, 1991).

2.2.5.2. Razas fisiológicas.

El primer reporte de la variabilidad de *P. infestans* fue realizada por Gidding y Berg en 1919 (citado por Romero, 1993; Gallegly, 1968) quienes observaron que los aislamientos de papa fueron patogénicos únicamente a papa, mientras que aquellos de tomate fueron más patogénicos a papa que a tomate. Posteriormente se observó que éste patógeno adquiría progresivamente más virulencia mediante transferencia sucesivas en variedades resistentes (Reddick y Mills, 1938).

En 1956 Black encontró en México 16 razas fisiológicas de *P. infestans* con la ayuda de una serie de plantas diferenciales que obtuvo al cruzar *Solanum demissum* con variedades comerciales, comprobando la diversidad del patógeno en México (Gallegly, 1968). Esta

variación se debía no solo al efecto de mutaciones sino a mecanismos de hibridación que ocurrían por sí solos en campo entre los grupos de compatibilidad (Romero y Erwin, 1967) citado por Castro (1962).

2.2.5.3. Sensibilidad a metalaxil.

El metalaxil es un funguicida del grupo de las fenilamidas, descubierto en 1977. Se caracteriza por ser un producto sistémico, con excelente acción protectante y con efecto curativo contra oomicetos, de los cuales inhibe la polimerasa del ARN ribosomal (Gisi y Cohen, 1996). Gracias a su espectro de acción y a su excelente control ha sido utilizado indiscriminadamente en la agricultura mundial. En 1980 se reporto el primer caso de resistencia de éste producto, ocasionando una gran epidemia en Holanda, Irlanda y Suiza (Davidse *et al.*, 1983), suspendiéndose su comercialización por 4 años en esos países hasta que se formuló como mezcla con mancozeb (Gisi y Cohen, 1996).

Durante 1981 a 1984 se observó un decremento en la resistencia a metalaxil en Irlanda y Holanda, como consecuencia de la no aplicación. Sin embargo posteriormente se han incrementado los niveles de resistencia a niveles alarmantes (Gisi y Cohen, 1996).

En Estados Unidos y Canada el primer reporte de resistencia a fenilamidas fue en 1991 en Washington y Columbia Británica. En Estados Unidos en 1992 se tenían frecuencias de resistencia de 46 %, en 1993 de 71 % y 1994 de 87 % ; y alrededor de 79 % en 1996 para Canada (Peters *et al.*, 1997).

Matuszack *et al.* (1994) observaron una mayor sensibilidad al metalaxil en aislamientos del centro de México (Michoacán y Estado de México) que en los aislamientos colectados en Coahuila y Sinaloa. También observaron que los aislamientos resistentes a metalaxil ocurrían con la misma frecuencia en papa, tomate y especies silvestres de *Solanum* en una misma región geográfica. Esto demuestra dos hechos repetidamente comprobados posteriormente; a). existe mayor presión de selección en la agricultura extensiva de riego y de alta tecnología, que en la de temporal; y b) no hay especificidad de hospedantes (Grünwald *et al.*, 2001; Guzmán-Galindo, 2002; Flier *et al.*, 2003).

Deahl *et al.* (1995) encontraron frecuencias de resistencia a metalaxil de 63 y 77 % respectivamente, siendo éstos del tipo de compatibilidad A2; también reportan una mayor frecuencia de resistencia al metalaxil en aislamientos A2 en comparación a A1 en Florida y Texas, no así en California donde los niveles más altos de resistencia se encontraron en A1. Peters *et al.* (1998) encontraron en Canada que los aislamientos A2 fueron moderadamente resistentes a metalaxil. En Finlandia y Noruega, Hermansen *et al.* (2000) reportaron una mayor resistencia a metalaxil en aislamientos A1 que en los A2. En aislamientos del Valle de Toluca de 1997-1998, Grünwald *et al.* (2001) observaron la misma frecuencia de resistencia a metalaxil que Matuszak *et al.* (1994) en 1988.

2.2.6. Marcadores moleculares.

Un marcador molecular es cualquier molécula (proteína, enzima, ADN ó ARN) cuya expresión refleja cambios a nivel de secuencias de ADN que pueden ser detectados en

forma directa o con técnicas electroforéticas (Valadez y Kahl, 2000). Cuando los marcadores moleculares presentan comportamientos de acuerdo a las leyes básicas de la herencia Mendeliana se conocen como marcadores genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.2.6.1. Isoenzimas.

Las isoenzimas son múltiples formas moleculares de la misma enzima presentes en una especie, codificadas por mas de un gen. Mediante la electroforesis de enzimas se ha estudiado la variabilidad genética de poblaciones naturales, sus procesos de hibridación, así como estudios de dispersión de especies y análisis filogenéticos (Towner y Cockayne, 1993; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La expresión de las isoenzimas es codominante por lo cual un individuo diploide expresa la visualización de ambos alelos en un mismo locus. Las enzimas monoméricas están formadas por un polipéptido, las diméricas por dos y así sucesivamente. Los individuos heterocigotos para una enzima dimérica, además de las dos bandas correspondientes a los polipéptidos, presentan una tercer banda intermedia producto de la conjugación de ambos polipéptidos; de la misma forma, individuos heterocigotos para una enzima tetramérica presentan tres bandas intermedias producto de la conjugación de ambos polipéptidos. Cada banda producida en la electroforesis es interpretada como un alelo diferente en un solo locus. En organismos diploides como *P. infestans* las enzimas *glucosa fosfato isomerasa (Gpi)* y *peptidasa (Pep)* son diméricas. Este organismo

presenta un alto grado de aneuploidia ó alteración en su número de cromosomas, que complican su análisis isoenzimático (Goodwin, sin año., Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.2.6.2. Estudio de isoenzimas en *P. infestans*

Toley *et al.* (1985) probaron la actividad de 38 isoenzimas, utilizando electroforesis en geles de almidón, de poblaciones asexuales de Estados Unidos, Canadá, Irlanda y Gales y los compararon con poblaciones sexuales de *P. infestans* de origen mexicano. Encontraron actividad en 17 isoenzimas y determinaron 24 loci, de las cuales 11 enzimas fueron monomórficas e idénticas para ambas poblaciones; 13 enzimas fueron polimórficas; sin embargo solo cuatro, *peptidasa (Pep)*, *glucosa fosfato isomerasa (Gpi)*, *xantina deshidrogenasa (Xdh)* y *enzima málica (Me-I)* pudieron ser visualizadas e interpretadas adecuadamente. De estas cuatro isoenzimas solo *Gpi* y *Pep* fueron polimórficas para ambas poblaciones.

Con fines comparativos, se han tomado como referencias el número de bandas y su desplazamiento de cepas norteamericanas. En el caso del genotipo US-7 para la isoenzima (*Gpi*), presenta un patrón de tres bandas con una intensidad 1:2:1, siendo la banda media heterodímera, con un doble de intensidad que las banda homodímeras de los extremos. En el caso del US-8 para (*Gpi*) se observan cinco bandas con una relación de intensidad 1:2:3:2:1. La designación de los valores a los alelos revelados en las bandas se han hecho de forma arbitraria, designando el valor de 100 al alelo más común y el valor del resto de los alelos se hace en base a su movilidad con respecto al alelo 100 (Goodwin, sin año., Goodwin, *et al.*, 1995 b). Cuadro 2 de apéndice.

Todas las líneas clonales presentes en el mundo descienden del genotipo más común; el US-1, el cual se originó de un ancestro mexicano y su variación se debe a los procesos de mutación de ADN nuclear y mitocondrial (*mt*) a lo largo de los años (Goodwin, 1997).

Con estos estudios se ha demostrado el cambio de la estructura genética de la población de *P. infestans*, al detectarse nuevos genotipos en aquellas regiones donde se ha reportado la presencia del grupo de compatibilidad A2, habiendo un desplazamiento de los viejos genotipos por las nuevas y más agresivas poblaciones del patógeno (Spielman *et al.*, 1991; Goodwin *et al.*, 1994 b; Goodwin, 1997).

En México los estudios isoenzimáticos han confirmado a la región del valle de Toluca como centro de origen de este patógeno, por la gran variabilidad de genotipos encontrados, algunos aun no reportados en otras regiones del mundo, como el alelo 78 para el locus *Pep* y 130 para *Gpi* (Garay-Serrano, 2001; Grünwald *et al.*, 2001).

3.2. Progreso de la enfermedad.

Las especies de *Solanum* fueron plantadas en la segunda quincena del mes de Junio del año 2000, sin ningún diseño experimental y expuestas a la infección natural del patógeno, fueron asperjadas con insecticidas semanalmente pero no con fungicidas. La severidad de la enfermedad en la planta, definida como el área foliar visiblemente enferma con respecto al % total del follaje, fue monitoreada semanalmente, calificándose con base a la escala de Henfling (1987).

3.3. Preparación del medio de centeno agar.

Para preparar un litro del medio de centeno agar, se utilizaron 100 ml de concentrado de centeno, 20 g de azúcar, 15 g de agar y 900 ml de agua. Esta mezcla se esterilizó y vació en cajas petri de 100 mm de diámetro para transferir aislamientos.

3.4. Preparación del concentrado de centeno.

Para preparar un litro de concentrado de centeno se pesaron 600 grs de centeno, los cuales se desinfestaron durante 10 min en un litro de una solución con cloro al 2 %, enjuagándose posteriormente hasta desaparecer el olor a cloro; en seguida se agregaron 500 ml de agua y se dejó reposar de 36 a 48 hrs. Después las semillas germinadas se lavaron dos veces y el centeno se licuó con un litro de agua. La mezcla se vació en dos matraces de dos litros, se taparon con aluminio y se incubaron al horno a 50 °C por 3

3.6.1. Preparación del tejido miceliar.

- Con una aguja, se obtuvo de la caja petri el micelio de cada aislamiento.
- Se colocó la muestra en un tubo de centrifugación de 1.5 ml que contenía 30 μ L de agua destilada, macerándose el tejido con una broca.
- Se centrifugó durante 20 segundos a 14 000 rpm.

3.6.2. Preparación de placas de acetato de celulosa y amortiguador.

Se preparó un amortiguador de Tris-Glicina con pH de 8.5. Las placas de acetato de celulosa se colocaron en un tanque cúbico que se llenó lentamente con el amortiguador. Las placas se usaron después de 20 minutos de estar inmersas en el amortiguador.

3.6.3. Electroforesis.

- Se colocaron 8-10 μ L del sobrenadante de la muestra centrifugada en los pozos de la placa de muestras.
- Se sacó una placa de acetato de celulosa del tanque con buffer Tris-Glicina y se secó con papel filtro. La placa se colocó en la base de alineación.
- Con el aplicador se transfirió la muestra al acetato 3 veces para *Gpi* y 5 veces para *Pep*. Se marcó con azul de bromofenol en uno de los extremos de la placa.
- En la cámara de electroforesis, previamente llenado con el buffer de Tris-Glicina a pH de 8.5, se colocaron las placas de acetato de celulosa sobre los rieles.

- Se corrieron las placas a 180-200 volts por 20 minutos para *Gpi* y 15 minutos para *Pep*.

3.6.4. Tinción.

Se mezclaron los reactivos para cada una de las enzimas en agar (Cuadro 3, 4 de apéndice). La solución se vació sobre el gel hasta cubrirlo y se incubó de 1 a 2 horas en la oscuridad hasta que las bandas pudieran visualizarse. Posteriormente se removió el agar bajo el chorro de agua y se secó la placa en el horno a 60 °C.

Los genotipos de cada aislamiento para *Pep* y *Gpi* se dedujeron de acuerdo a la cantidad e intensidad de las bandas, así como al desplazamiento en la placa. Los organismos homocigotos se caracterizan por la presencia de una banda y los heterocigotos de 3 a 5 bandas como máximo. Para determinar los alelos obtenidos en este trabajo, se usaron como referencias los genotipos norteamericanos US-1, US-6, US-7 y US-8. (Cuadro 2 del apéndice).

3.7. Respuesta a metalaxil.

En cajas petri de 100 mm de diámetro, con medio centeno agar, se comparó el crecimiento micelial del patógeno a diferentes concentraciones de metalaxil, con un testigo sin fungicida. Para ello se preparó una solución en agua destilada estéril de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del producto comercial Ridomil Gold 4 E[®] al 46.2 % (483 g de i.a L⁻¹) de donde

hrs. La mezcla se coló en manta de cielo y se separaron alícuotas de 100 ml de concentrado de centeno, las cuales se guardaron en congelación hasta ser utilizadas.

3.5. Determinación del grupo de compatibilidad.

Para determinar los grupos de compatibilidad, se usaron como referencia los aislamientos 94a26.1 cuyo tipo de apareamiento es A1 y 99a133.1 caracterizado como del tipo de compatibilidad A2, ambos de la colección del PICTIPAPA.

En una caja petri de 60 mm de diámetro con medio centeno agar, se contrapuso un círculo de agar de 5 mm de diámetro con micelio de un aislamiento con tipo de compatibilidad desconocida a otro círculo de micelio de un aislamiento con tipo de compatibilidad conocido. Después de 13 días se observó al microscopio la presencia o ausencia de oosporas. Si el aislamiento produjo oosporas con el tipo A1, su tipo de compatibilidad correspondía al A2; si produjo con el tipo A2, se le asignó el tipo de compatibilidad A1 y si produjo oosporas tanto con A1 como A2 se consideró homotático.

3.6. Análisis isoenzimático.

Usando electroforesis en placas de acetato de celulosa se obtuvieron los genotipos para las enzimas glucosa-6-fosfato isomerasa (*Gpi*) y peptidasa (*Pep*), de acuerdo a la técnica descrita por Goodwin *et al.* (1995 b).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio del Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa (PCTIPAPA) ubicado en las instalaciones del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX) con sede en Metepec, Estado de México.

3.1. Material biológico.

Los 58 aislamientos de *P. infestans* utilizados en el presente trabajo fueron proporcionados de la colección del PCTIPAPA del año 2000, los cuales fueron obtenidos de lesiones naturales en ausencia de fungicidas de 6 especies silvestres de *Solanum* expuestas a la infección natural del patógeno en campo, por la Bióloga Edith Garay Serrano y mantenidos en nitrógeno líquido hasta el momento de su caracterización.

Cuadro 1. Especies de *Solanum*, numero de aislamientos utilizados y origen de la especie.

Especie	Numero de aislamientos	Origen
<i>Solanum phureja</i> (S)*	24	Colombia, Venezuela, Perú
<i>Solanum acaule</i> (S)	18	Argentina, Bolivia y Perú
<i>Solanum bulbocastanum</i> (R)**	4	México y Centroamérica
<i>Solanum andreanum</i> (R)	2	Sudamérica
<i>Solanum caripense</i> (R)	5	Sudamérica
<i>Solanum muricatum</i> (R)	5	Sudamérica

*S. Susceptible a *P. infestans* bajo las condiciones de Toluca.

**R. Resistente a *P. infestans* bajo las condiciones de Toluca.

se obtuvieron diluciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de las cuales se adicionaron al medio centeno agar estéril antes de ser vaciados en las cajas petri. En estos medios se colocó en el centro de cada caja un disco de 0.5 cm de crecimiento periférico de un aislamiento con edad de 15 días. Se evaluó el crecimiento miceliar a los 13 días, tomándose dos medidas perpendiculares al diámetro del crecimiento y se le resto el diámetro del disco (0.5 cm). Con el valor promedio de dos repeticiones por tratamiento de cada uno de los aislamientos, se calculó el porcentaje de crecimiento con respecto al testigo.

3.8. Análisis de distancia genéticas.

Se realizó un análisis de distancias genéticas modificada de Rogers (UPGMA) para verificar el coeficiente de similitud e índice de identidad de las poblaciones del patógeno. El UPGMA es un procedimiento que provee de una representación gráfica de las distancias genéticas de los datos, lo que permite hacer inferencias de relaciones posibles entre las poblaciones de estudio (Miller, 1997). Para el análisis UPGMA los datos del tipo de compatibilidad fueron considerados como heterocigotos para A1 y como homocigoto para A2. También para este análisis no se consideraron los genotipos cuyas lecturas para Gpi fueron 100/111/122, ya que el programa TFPGA, con el que se hizo el análisis UPGMA, solo considera datos con dos alelos para los organismos diploides.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Severidad de la enfermedad en las especies evaluadas

Aun cuando todas las especies de *Solanum* fueron expuestas en campo a la misma presión del inóculo, estas presentaron diferentes comportamientos entre especies y entre clones de la misma especie.

4.1.1. *Solanum phureja*.

Los clones de *S. phureja* presentaron diferentes índices de severidad al patógeno, considerándose todos como altamente susceptibles a *P. infestans* (Figura 1) y sus aislamientos fueron resistentes a metalaxil. Esta información refleja variación en el grado de resistencia entre individuos de la misma especie.

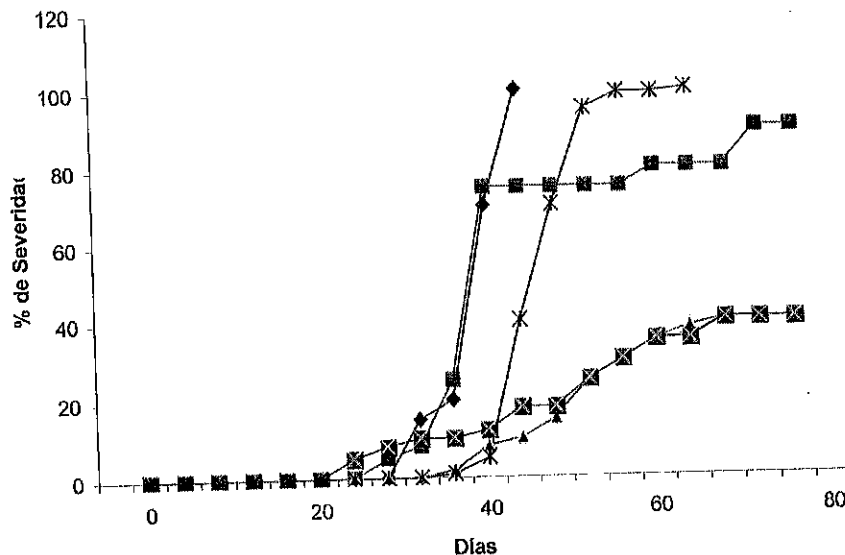


Figura 1. Respuesta de cinco clones de *S. phureja* al ataque de *P. infestans* en el Valle de Toluca, México.

4.1.2. *Solanum acaule*.

El mismo comportamiento de *S. phureja* presentaron los clones de *S. acaule* (Figura 2). Es importante señalar la variación en la respuesta de los clones de *S. acaule* al ataque del patógeno, como una respuesta a la variación de la resistencia en la misma especie de *Solanum*, esto debido a que hubo clones que llegaron al 100 % de severidad en menor tiempo, en tanto que otros clones el % de severidad se mantuvo constante. Todos los aislamientos de *P. infestans* obtenidos en esta especie fueron resistentes a metalaxil y con una proporción de A1:A2 de 1:1.

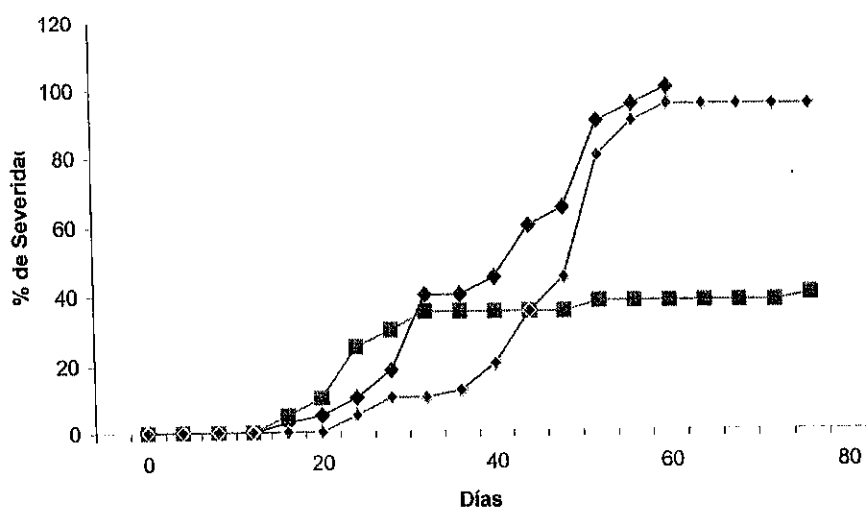


Figura 2. Respuesta de tres clones de *S. acaule* al ataque de *P. infestans* en el Valle de Toluca, México.

4.1.3. *Solanum bulbocastanum*, *Solanum caripense*, *Solanum andreanum* y *Solanum muricatum*.

Los clones de *S. bulbocastanum*, *S. caripense*, *S. andreanum* y *S. muricatum* pueden ser considerados como altamente resistentes a *P. infestans* si se considera el % de severidad que presentaron (Figura 3). Sin embargo aun cuando son resistentes al tizón tardío, es importante señalar que *S. muricatum* presentó solo aislamientos A1 resistentes a metalaxil, en tanto que *S. caripense* presento aislamientos A1 y A2 resistentes al metalaxil. *S. bulbocastanum* y *S. andreanum* podrían ser consideradas las mejores fuentes de resistencia a *P. infestans* por los bajos % de severidad que presentaron y por ser todos A1 y susceptibles a metalaxil.

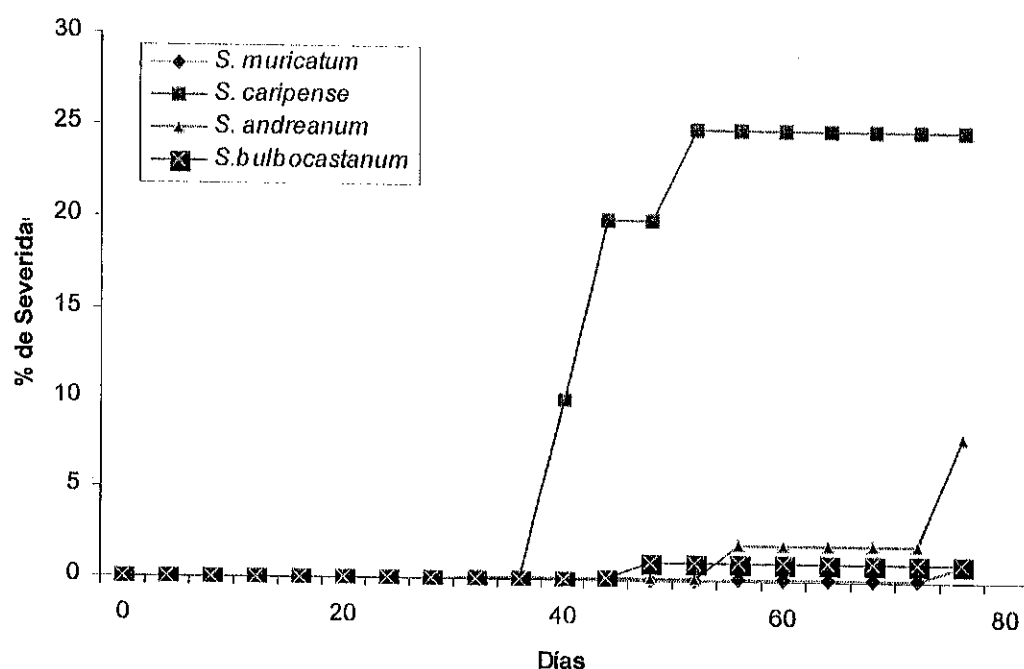


Figura 3. Respuesta de *S. caripense*, *S. bulbocastanum*, *S. andreanum* y *S. muricatum* al ataque de *P. infestans* en el Valle de Toluca, México.

4.2. Grupo de Compatibilidad (G.C.) y perfil isoenzimático.

De los 58 aislamientos estudiados se encontraron 19 genotipos multilocus (Cuadro 2), todos ellos reportados (Grünwald *et al.*, 2001). Los genotipos dominantes fueron A2 con 100/100 para *Gpi* y 100/100 para *Pep*, con una frecuencia de 15.5 %; en tanto que el grupo de compatibilidad A1 presentó dos genotipos dominantes 86/100 y 100/100; y el 86/100, 92/100 con un 10.3 % cada uno. Los genotipos con menos frecuencia fueron para A2 100/111/122, 100/100; y el 86/86, 100/100, ambos con 1.7 %; los genotipos menos frecuentes con grupo de compatibilidad A1 fueron 83/100, 100/100; 86/100, 96/100; y el 100/111/122, 92/100, además del homotálico 86/86, 100/100, cada uno de ellos con una frecuencia de 1.7 %. Se detectaron dos genotipos norteamericanos, el US-1 con una frecuencia de 10.3 % y el US-8, considerado un genotipo muy agresivo en Estados Unidos, con una frecuencia de 1.7 %.

La proporción encontrada para los grupos de compatibilidad A1:A2 fue de 1:0.9, la cual se aproxima a la 1:1 reportada por múltiples autores. En esta población también se presentaron algunos aislamientos homotálicos, 8.6 % de la población estudiada.

Cuadro 2. Frecuencias de genotipos de *P. infestans* aislados de 6 especies silvestres de *Solanum*. Toluca, México, 2000.

Genotipo	G.C.	<i>Gpi</i> ^{***}	<i>Pep</i> ^{***}	Número	Frecuencia (%)
1	A2	100/100	100/100	9	15.5
2	A2	86/100	92/100	4	6.8
3	A2	86/122	92/100	4	6.8
4	A2	86/100	100/100	4	6.8
5	A2	86/122	96/100	2	3.4
6*	A2	100/111/122	100/100	1	1.7
7	A2	86/86	100/100	1	1.7
8	A1	86/100	100/100	6	10.3
9**	A1	86/100	92/100	6	10.3
10	A1	100/100	100/100	4	6.8
11	A1	86/122	96/100	4	6.8
12	A1	86/122	100/100	3	5.1
13	A1	100/111/122	100/100	2	3.4
14	A1	83/100	100/100	1	1.7
15	A1	86/100	96/100	1	1.7
16	A1	100/111/122	92/100	1	1.7
17	Hom	86/122	100/100	2	3.4
18	Hom	83/100	100/100	2	3.4
19	Hom	86/86	100/100	1	1.7

(*). US-8. Cuadro 2 de apéndice. (**). US-1. Cuadro 2 de apéndice.

(***). Desplazamiento relativo de las bandas, con respecto a aislamientos tipo.

4.2.1. Grupo de Compatibilidad (G.C.) y perfil isoenzimático por especie de hospedante.

4.2.1.1. *Solanum phureja*.

De la especie *S. phureja* se obtuvieron 24 aislamientos, en los cuales se observaron 13 genotipos multilocus diferentes. El genotipo dominante en el grupo de compatibilidad A2 fue 100/100 en *Gpi* y 100/100 en *Pep* con una frecuencia de 22 %; en tanto que en A1 no hubo ningún genotipo dominante, destacándose entre ellos a 100/111/122, 100/100; 86/100, 100/100 y 86/122, 100/100 de *Gpi* y *Pep* respectivamente (Cuadro 3). En esta población se encontró una relación de 8:13 (A1:A2), que da una proporción de 0.6:1 respectivamente. También se encontraron tres genotipos homotáticos. Aun cuando la proporción del tipo de compatibilidad no es 1:1, es importante resaltar la enorme diversidad genética de *P. infestans* en el Valle de Toluca, aun con el número reducido de aislamientos, lo que confirma el origen sexual de la población y la teoría de Goodwin (1996) y Grünwald *et al.*, (2001) sobre el origen del patógeno.

Cuadro 3. Frecuencias de genotipos de *P. infestans* aislados de *S. phureja*. Toluca, México, 2000.

Genotipo	G.C.	<i>Gpi</i> ***	<i>Pep</i> ***	Número	Frecuencia (%)
1	A2	100/100	100/100	5	22
2	A2	86/100	92/100	3	13
3	A2	86/122	92/100	2	8
4*	A2	100/111/122	100/100	1	4
5	A2	86/122	96/100	1	4
6	A2	86/100	100/100	1	4
7	A1	100/111/122	100/100	2	8
8	A1	86/100	100/100	2	8
9	A1	86/122	100/100	2	8
10**	A1	86/100	92/100	1	4
11	A1	83/100	100/100	1	4
12	Hom	86/122	100/100	2	8
13	Hom	86/86	100/100	1	4

(*). US-8. Cuadro 2 de apéndice.

(**). US-1. Cuadro 2 de apéndice.

(***). Desplazamiento relativo de las bandas, con respecto a aislamientos tipo.

4.2.1.2. *Solanum acaule*.

De esta especie se trabajó con 18 aislamientos, de la cual se encontraron nueve genotipos multilocus, encontrándose con mayor frecuencia el 100/100 para *Gpi* y 100/100 para *Pep* con grupo de compatibilidad A2 y 100/100 y 100/100 para *Gpi* y *Pep* con grupo de compatibilidad A1 respectivamente. La proporción de los grupos de compatibilidad observada de A1:A2 en esta población fue de 1:1. También se detectaron dos aislamientos homotáticos con genotipo 83/100 para *Gpi* y 100/100 para *Pep* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Frecuencia de genotipos de *P. infestans* aislados de *S. acaule*. Toluca, México, 2000.

Genotipo	G.C.	<i>Gpi</i> ***	<i>Pep</i> ***	Número	Frecuencia (%)
1	A2	100/100	100/100	4	22
2	A2	86/100	100/100	2	11
3	A2	86/86	100/100	1	5.5
4	A2	86/122	96/100	1	5.5
5	A1	100/100	100/100	4	22
6	A1	86/122	96/100	2	11
7	A1	86/100	100/100	1	5.5
8	A1	86/122	100/100	1	5.5
9	Hom	83/100	100/100	2	11

(***). Desplazamiento relativo de las bandas, con respecto a aislamientos tipo.

4.2.1.3. *Solanum bulbocastanum*.

A diferencia de las especies anteriores, en esta se trabajaron cuatro aislamientos, sin embargo se encontraron tres genotipos multilocus diferentes, sobresaliendo el 86/122 para *Gpi* y el 96/100 para *Pep* con un 50 %. Los cuatro aislamientos fueron del tipo de compatibilidad A1 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Frecuencia de genotipos de *P. infestans* aislados de *S. bulbocastanum*. Toluca, México, 2000.

Genotipo	G.C.	<i>Gpi</i> ***	<i>Pep</i> ***	Número	Frecuencia (%)
1	A1	86/122	96/100	2	50
2	A1	86/100	100/100	1	25
3	A1	86/100	96/100	1	25

(***).Desplazamiento relativo de las bandas, con respecto a aislamientos tipo.

4.2.1.4. *Solanum caripense*.

Los cinco aislamientos de esta especie presentaron cuatro genotipos multilocus diferentes, lo que demuestra nuevamente la enorme variabilidad del patógeno en el Valle de Toluca, de estos, el 80 % fue A2 y 20 % A1. El genotipo sobresaliente en esta población fue el A2 86/122 para *Gpi* y 92/100 para *Pep*; la proporción A1:A2 de los grupos de compatibilidad fue 0.25:1 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Frecuencias de genotipos de *P. infestans* aislados de *S. caripense*. Toluca, México, 2000.

Genotipo	G.C.	<i>Gpi</i> ***	<i>Pep</i> ***	Número	Frecuencia (%)
1	A2	86/122	92/100	2	40
2	A2	86/100	92/100	1	20
3	A2	86/100	100/100	1	20
4	A1	100/111/122	92/100	1	20

(***). Desplazamiento relativo de las bandas, con respecto a aislamientos tipo.

4.2.1.5. *Solanum muricatum*.

De cinco aislamientos obtenidos, todos fueron A1 con 86/100 para *Gpi* y 92/100 para *Pep* (Cuadro 7). Este genotipo ha sido reportado como el causante de la hambruna en Irlanda y es muy común en los valles altos de México, de donde se cree fue llevado a Estados Unidos en 1840s y de ahí a Europa (Goodwin *et al.*, 1994 a., Goodwin *et al.*, 1994 b).

Cuadro 7. Frecuencia de genotipos de *P. infestans* aislados de *S. muricatum*. Toluca, México, 2000.

Genotipo	G.C.	<i>Gpi</i> ***	<i>Pep</i> ***	Número	Frecuencia (%)
1**	A1	86/100	92/100	5	100

(**). US-1. Cuadro 2 de apéndice.

(***). Desplazamiento relativo de las bandas, con respecto a aislamientos tipo.

4.2.1.6. *Solanum andreanum*.

De *S. andreanum* se trabajo con dos aislamientos los cuales, al igual que la anterior especie todos fueron A1, presentando como único genotipo al 86/100 para *Gpi* y 100/100 para *Pep* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Frecuencias de genotipos de *P. infestans* aislados de *S. andreanum*. Toluca, México, 2000.

Genotipo	G.C.	<i>Gpi</i> ***	<i>Pep</i> ***	Número	Frecuencia (%)
1	A1	86/100	100/100	2	100

(***). Desplazamiento relativo de las bandas, con respecto a aislamientos tipo.

4.3. Resistencia a metalaxil de la población en estudio.

A $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ los aislamientos mostraron una tendencia hacia la resistencia conforme aumentaban los rangos de crecimiento, así el 33 % de estos crecieron más del 90 % respecto al testigo. A $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ los aislamientos se distribuyen en los diferentes rangos de crecimiento relativos al testigo, comprobando así la variabilidad del patógeno, el 13 % de los aislamientos creció más del 90 % respecto al testigo. A $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 35 % de los aislamientos creció menos del 10 % respecto al testigo, decreciendo la frecuencia de aislamientos conforme se incrementaban los rangos de crecimiento (Figura 4). Esta respuesta fue similar a la reportada por Matuzak *et al.* (1994) y Grünwald *et al.* (2001);

sin embargo esta tendencia fue diferente a la encontrada por Guzmán-Galindo (2002), quien a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ presento rangos de crecimiento menores a 60 % respecto al testigo.

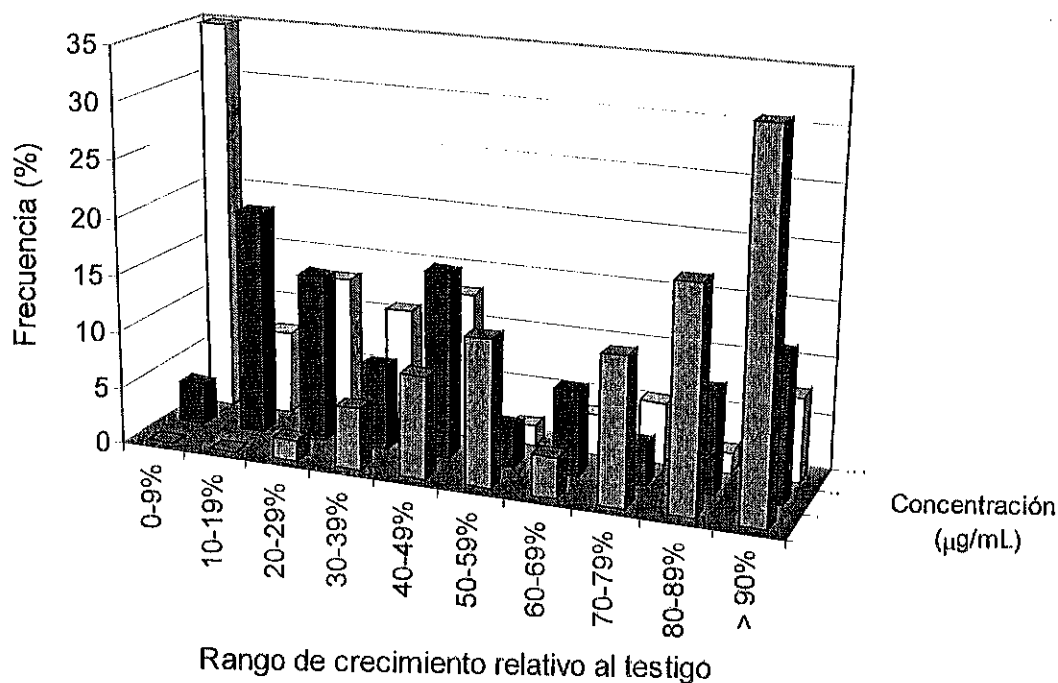


Figura 4. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimientos relativos de la población de *P. infestans* obtenida de especies silvestres de *Solanum*.

4.3.1. Resistencia a metalaxil por especies silvestres de *Solanum*.

El análisis de *P. infestans* obtenido de *S. andreaeanum* no se incluye en el texto por contar sólo con dos aislamientos, los cuales fueron resistentes a metalaxil. El resultado se incluye en la Figura 1 del apéndice.

4.3.1.1. *Solanum phureja*.

Los aislamientos de esta especie presentaron un comportamiento muy similar al de la población en general (Figura 4). En presencia de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 38 % de los aislamientos creció más del 90 % respecto al testigo. A $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ los aislamientos presentaron una tendencia de moderadamente resistente a altamente resistente a metalaxil ya que el 24 % creció al equivalente a 90 % del testigo. A $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 19 % de los aislamientos creció menos del 10 %; en esta concentración la mayoría de los aislamientos tendieron a la resistencia, pues el 14 % de ellos creció más del 90 % respecto al testigo (Figura 5).

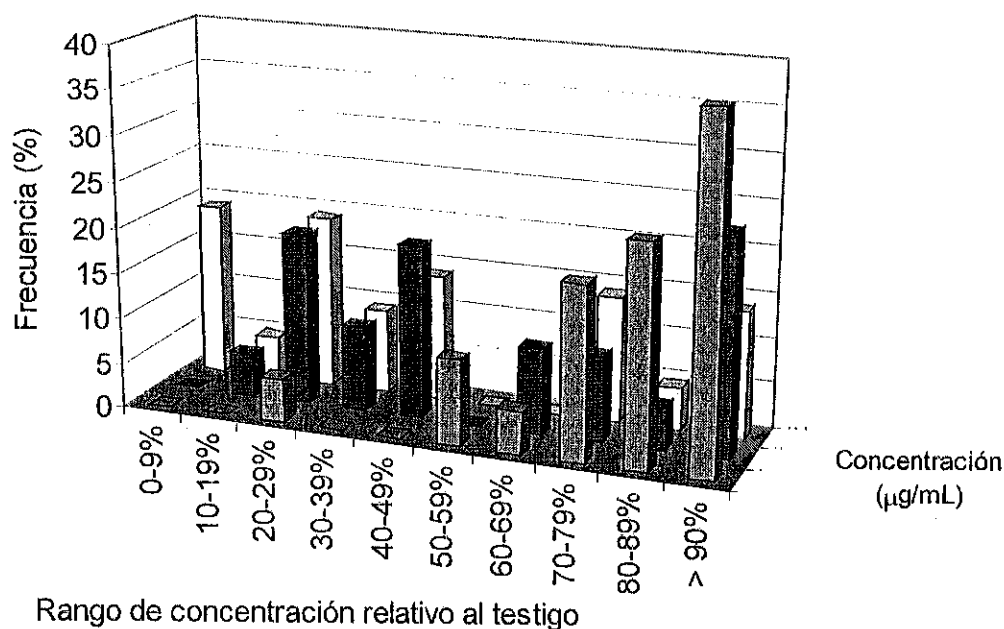


Figura 5. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de *Solanum phureja*.

4.3.1.2. *Solanum acaule*.

En estos aislamientos se observó un comportamiento decreciente conforme aumentaba la concentración de metalaxil. A $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 24 % de los aislamientos creció más del 90 % respecto al testigo. Mientras que a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ solo el 6 % de los aislamientos tuvo el mismo crecimiento y el 12 % de ellos fue sensible a metalaxil al crecer menos del 10 % respecto al testigo. A $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 60 % creció menos del 10 % (Figura 6).

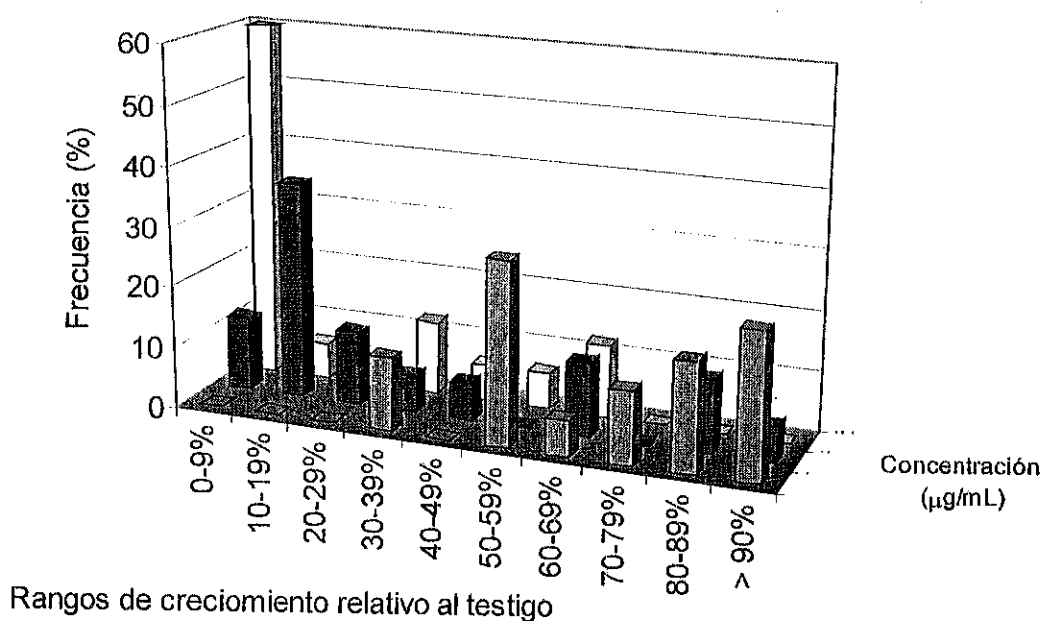


Figura 6. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de *Solanum acaule*.

4.3.1.3. *Solanum bulbocastanum*.

De esta especie se trabajó con cuatro aislamientos, los cuales presentaron un comportamiento con tendencia a la susceptibilidad a metalaxil en las tres

concentraciones. A $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 100 % de los aislamientos creció en un rango de 40-80 % con respecto al testigo. A $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 100 % de los aislamientos creció menos del 30 %, en tanto que a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ todos los aislamientos crecieron menos del 20 % respecto al testigo (Figura 7).

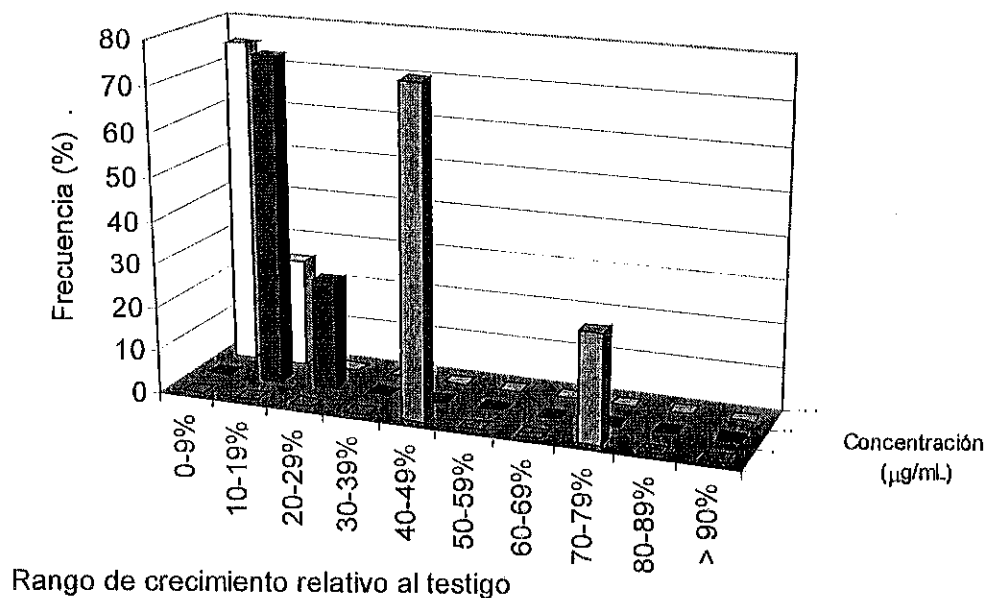


Figura 7. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de *Solanum bulbocastanum*.

4.3.1.4. *Solanum caripense*.

Los aislamientos de esta especie presentaron un comportamiento similar a *S. phureja* y *S. acaule* al presentar diferentes grados de susceptibilidad a metalaxil en las tres concentraciones. A $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 40 % de los aislamientos creció más que el testigo. A $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ los aislamientos presentaron una tendencia moderadamente resistente; a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ los aislamientos fueron de susceptibles a moderadamente resistentes al presentar rangos de crecimientos menores al 50 % (Figura 8).

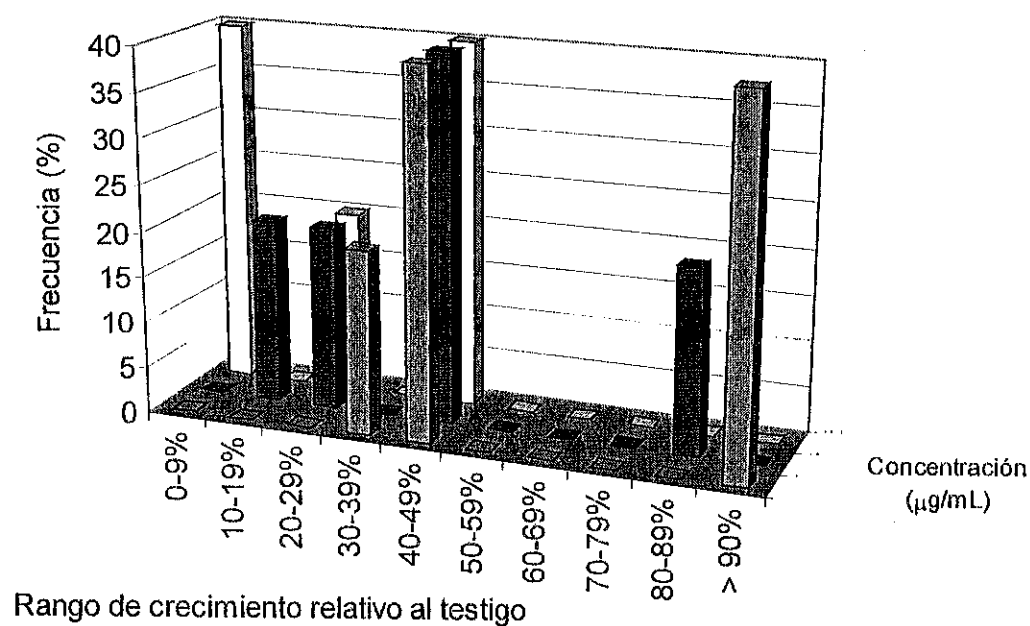


Figura 8. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de *Solanum caripense*.

4.3.1.5. *Solanum muricatum*.

El comportamiento de estos aislamientos presenta una tendencia hacia la resistencia a metalaxil en las tres concentraciones. A $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ todos los aislamientos crecieron más del 80 % respecto al testigo. A $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 40 % de los aislamientos crecieron más del 80 % y a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ el 20 % de ellos creció mas del 90 % respecto al testigo (Figura 9).

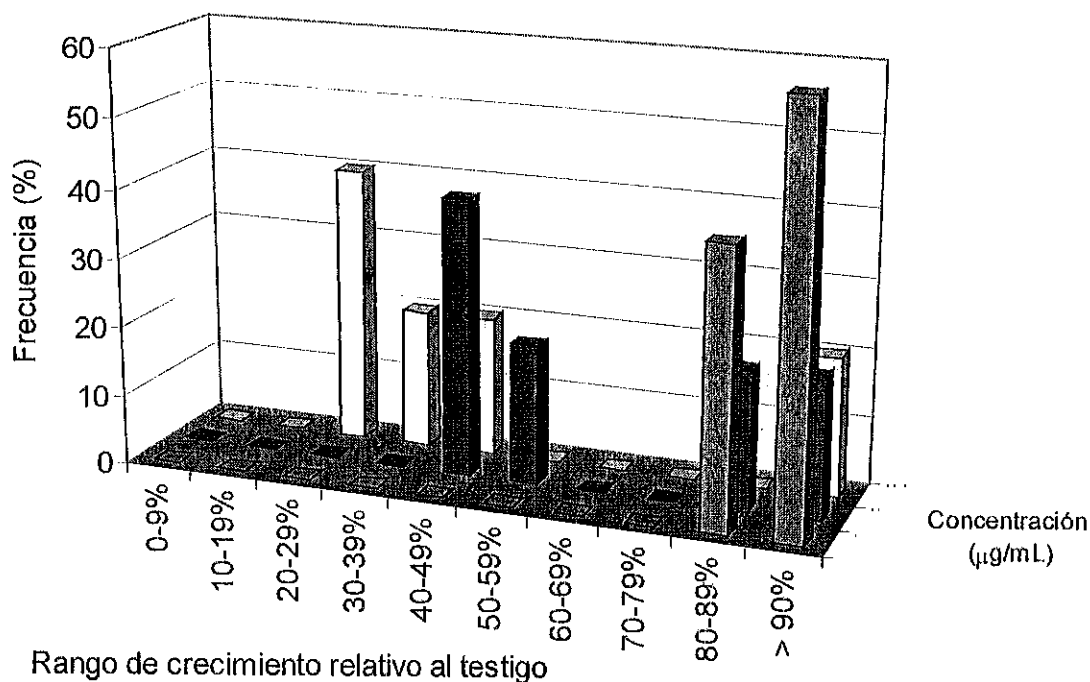


Figura 9. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo procedentes de *Solanum muricatum*.

4.3.2. Respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3.2.1. General.

De acuerdo al criterio de Shattock, (1998) sobre resistencia a metalaxil, el 4 % de los aislamientos fueron sensibles al metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, reflejando en ello el alto grado de resistencia presente en la población del patógeno del Valle de Toluca. El 63 % de los aislamientos son considerados moderadamente resistentes y el 33 % como altamente resistente a metalaxil (Figura 10). Esto indica una evolución hacia la resistencia si se considera que hace 10 años presentaba mayor sensibilidad (Matuszak *et al.*, 1994).

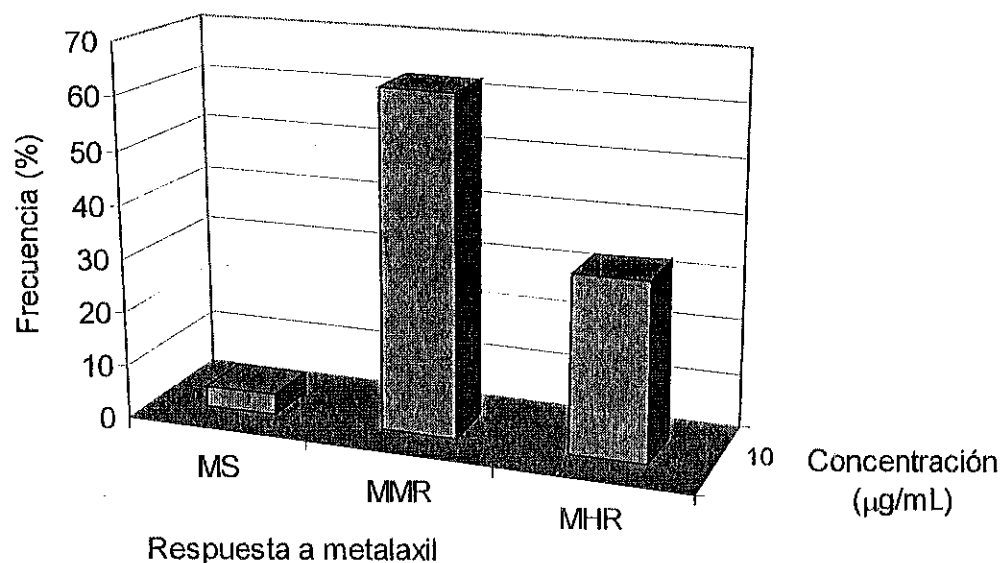


Figura 10 . Respuesta a metalaxil de la población de *P. infestans* obtenida de especies silvestres de *Solanum* a 10 µg mL⁻¹. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).

4.3.2.2. Por especie.

Todas las especies evaluadas presentaron tendencias de resistencia a metalaxil, sobresaliendo entre ellas *S. phureja* de la cual 10 aislamientos fueron altamente resistentes. *S. acaule* fue otra de las especies que presentaron aislamientos altamente resistentes, al igual que *S. caripense* y *S. muricatum*. Sin embargo *S. bulbocastanum* y *S. andreamum* presentaron solamente aislamientos moderadamente resistentes, por lo que podrían ser especies candidatas en programas de mejoramiento genético (Figura 11).

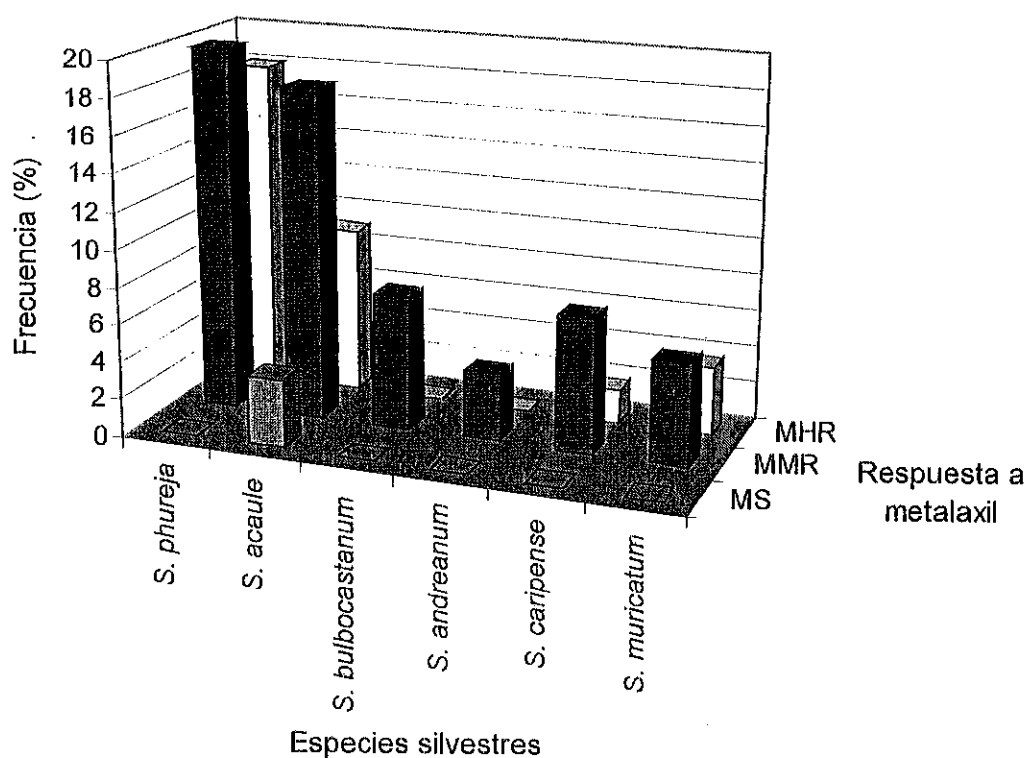


Figura 11. Distribución de la respuesta a metalaxil de especies silvestres a 10 µg mL⁻¹. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistentes a metalaxil).

Los datos anteriores reflejan el alto grado de resistencia a metalaxil presente en la población del patógeno obtenida de las especies silvestres.

4.3.3. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a 10 µg mL⁻¹.

La relación encontrada entre el grupo de compatibilidad y la respuesta a metalaxil a 10 µg mL⁻¹ permite determinar la distribución de la resistencia. De la población evaluada el

41 % de los aislamientos del grupo de compatibilidad A1 fueron considerados como moderadamente resistentes a metalaxil, mientras que el 7.5 % de estos aislamientos fueron caracterizados como altamente resistentes. En el grupo de compatibilidad A2 el número de aislamientos moderadamente resistentes y altamente resistentes a metalaxil fueron prácticamente los mismos (22 % y 20 % respectivamente), en tanto que todos los aislamientos homotáticos fueron catalogados como altamente resistentes (Figura 12).

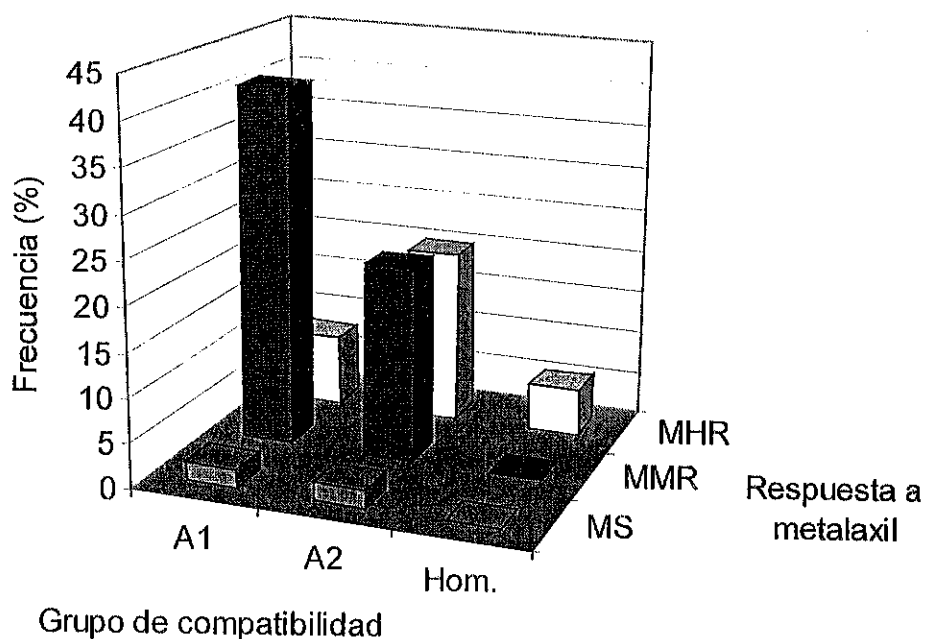


Figura 12. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).

La información anterior refleja que los aislamientos altamente resistentes a metalaxil se encuentran con mayor frecuencia en la población de *P. infestans* del grupo de compatibilidad A2 y homotáticos, consecuentemente considerados como altamente

agresivos. Estos datos coinciden con los reportados por Deahl *et al* (1995) en los aislamientos mexicanos.

4.3.3.1. Relación entre el Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ por especie silvestre.

4.3.3.1.1. *Solanum phureja*

La distribución de la resistencia a metalaxil en esta especie guarda una similitud con el comportamiento de la resistencia de la población bajo estudio (Figura 12). El 29 % de los aislamientos del grupo de compatibilidad A1 fueron moderadamente resistentes y únicamente el 9 % de estos aislamientos fueron altamente resistentes al metalaxil. En el grupo de compatibilidad A2 el 34 % de los aislamientos fueron altamente resistentes a metalaxil, al igual que un aislamiento homotálico (Figura 13). De acuerdo a la información anterior la población de *P. infestans* de *S. phureja* presenta un alto grado de resistencia a metalaxil.

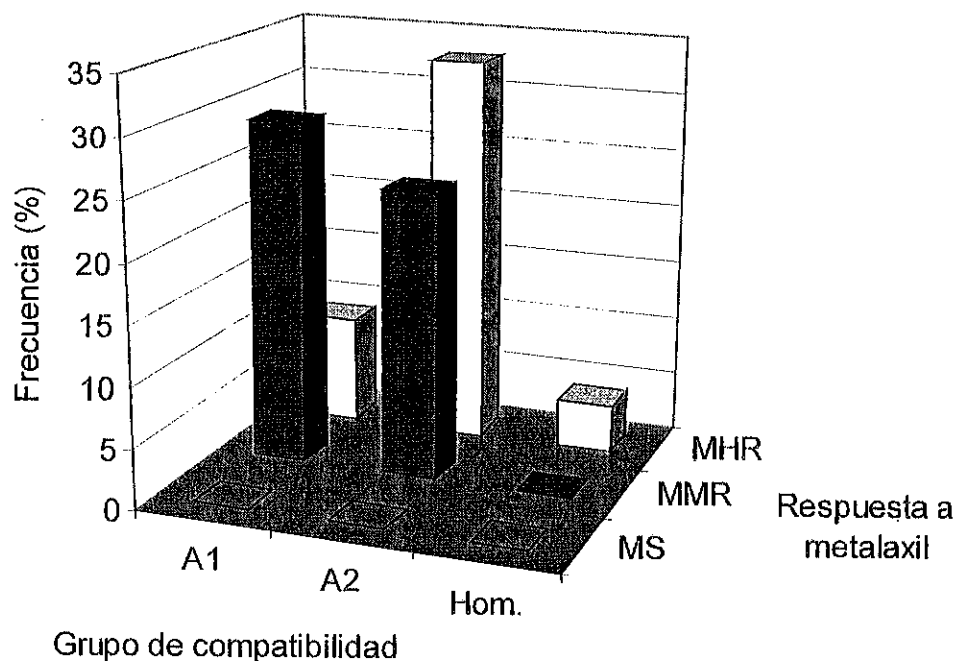


Figura 13. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Solanum phureja*. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil)

4.3.3.1.2. *Solanum acaule*

La población de *S. acaule* se caracteriza por presentar en el grupo de compatibilidad A1 mas del 34 % de los aislamientos moderadamente resistentes a metalaxil, además el 6 % de los aislamientos de este mismo grupo de compatibilidad fueron susceptibles a metalaxil. En tanto que en los aislamientos A2 el 23 % de estos fueron moderadamente resistentes a metalaxil y el 18 % de ellos altamente resistentes, al igual que todos los aislamientos homotáticos (Figura 14). De acuerdo a los resultados anteriores *P. infestans* presenta una mayor resistencia a metalaxil en aislamientos A2 y homotáticos.

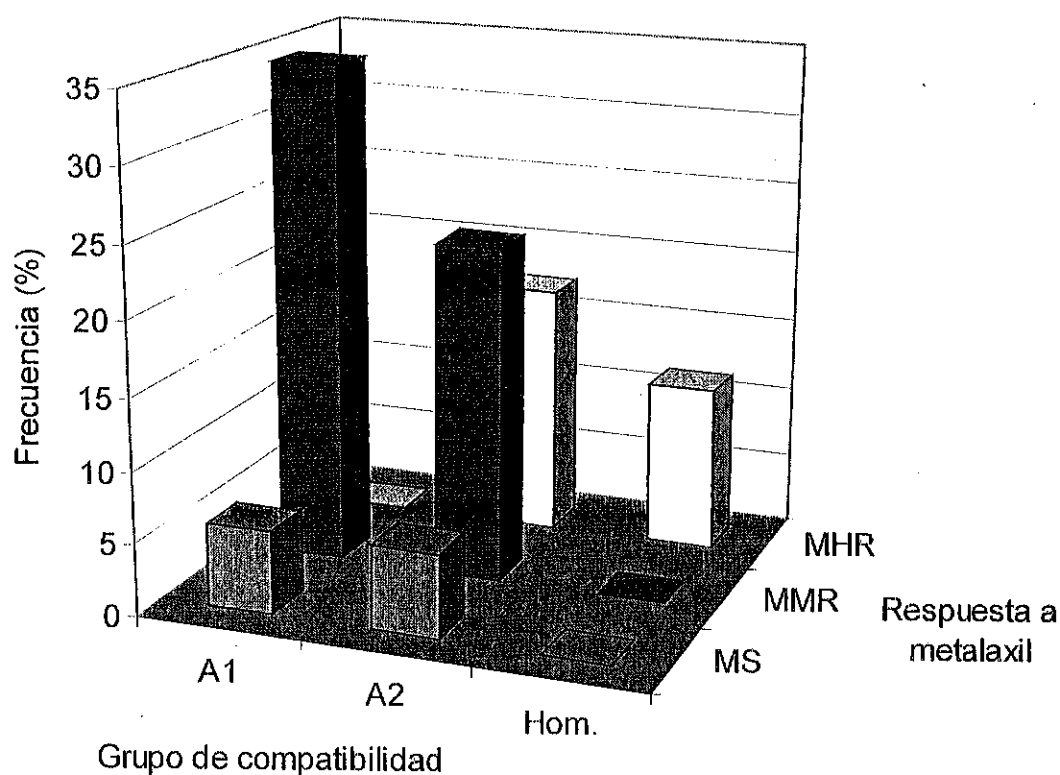


Figura 14. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Solanum acaule*. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).

4.3.3.1.3. *Solanum caripense*

El 20 % de los aislamientos de esta especie en el grupo de compatibilidad A1 fueron moderadamente resistentes a metalaxil, en tanto que el 60 % de los aislamientos del grupo de compatibilidad A2 presentaron esta misma respuesta, además en el grupo de compatibilidad A2 el 20 % de estos fueron altamente resistentes a metalaxil (Figura 15).

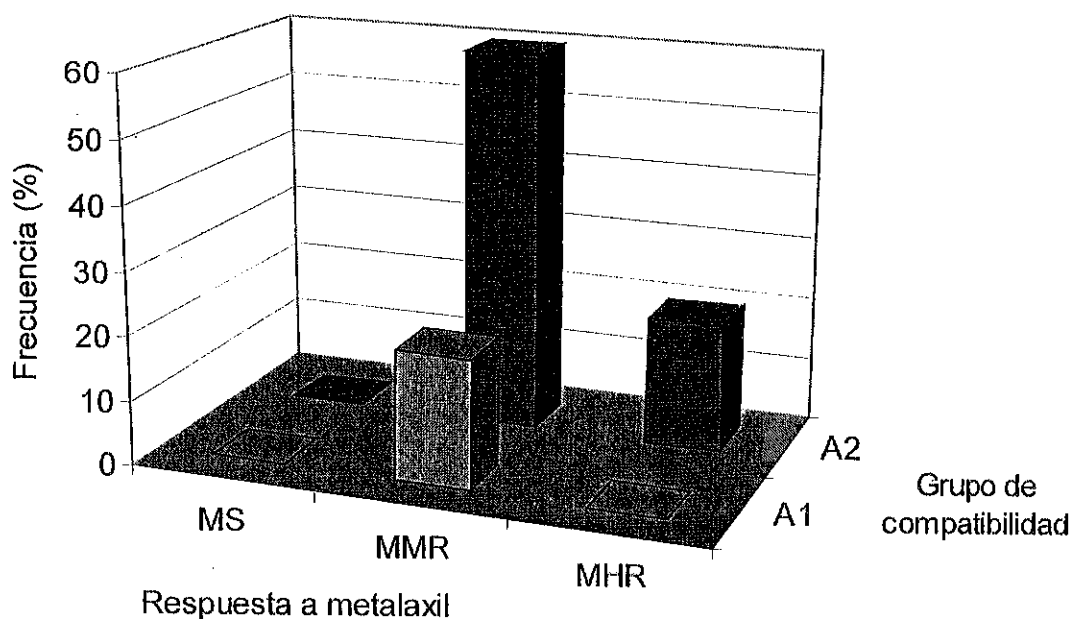


Figura 15. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Solanum caripense*. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).

Las figuras de *S. muricatum*, *S. bulbocastanum* y *S. andreanum* fueron reportadas en el apéndice. En *S. muricatum* el 100 % de los aislamientos fueron A1, de los cuales 60 % fue moderadamente susceptible a metalaxil y el 40 % altamente resistente (Figura 2 de apéndice). Los aislamientos de *S. bulbocastanum* fueron en su totalidad A1, donde el 100 % de ellos fue moderadamente resistente a metalaxil (Figura 3 de apéndice). En *S. andreanum* el comportamiento de los aislamientos fue similar a *S. bulbocastanum*, es decir, el 100 % de los aislamientos fue moderadamente resistente a metalaxil y del grupo de compatibilidad A1 (Figura 4 de apéndice).

4.4. Agrupamiento genético

De acuerdo a la información proporcionada por el análisis UPGMA la población de *P. infestans* aislada de *S. phureja* (1) y de *S. acaule* (2), ambas especies de origen andino, presentan un coeficiente de similitud de 0.0183 y un índice de identidad de 0.9819, por lo que esta población se encuentra muy relacionada, a tal grado que ambas presentaron una proporción muy cercana 1:1 de A1 y A2 y muy resistentes a metalaxil, muy susceptibles al ataque del patógeno, además el genotipo multilocus dominante en ambas poblaciones fue A2 con 100/100 tanto en *Gpi* como en *Pep*. *S. bulbocastanum* (3) de origen mexicano, y *S. andeanum* (4) de origen sudamericano, presentan un coeficiente de similitud de 0.0638 y un índice de identidad de 0.9382, los aislamientos de estas especies fueron todos A1 y moderadamente resistentes a metalaxil, siendo estas especies resistentes al ataque del patógeno, por lo que serían buenas fuentes de resistencia a *P. infestans*; el punto de intersección entre las poblaciones 1, 2, 3 y 4 presenta un coeficiente de similitud de 0.0949 (Figura 16).

El coeficiente de similitud entre las poblaciones 1, 2, 3, 4 con la población de *S. muricatum* (6), especie sudamericana, es de 0.1684, esto debido a que los aislamientos de *S. muricatum* fueron el 100 % A1 y con genotipo multilocus 86/100 en *Gpi* y 92/100 en *Pep*, además de resistentes a metalaxil. En tanto que la población de *S. caripense* (5), también sudamericana, presenta un coeficiente de similitud de 0.1835 con el resto de las poblaciones. La figura 16 indica que la población de *P. infestans* en las especies silvestres de papa tienen un mismo origen a partir del coeficiente de similitud de 0.1835, sin embargo estas se encuentran mas relacionadas entre *S. phureja* (1) y *S. acaule* (2) y

entre *S. bulbocastanum* (3), única especie mexicana y *S. andreanum* (4); siendo la población de *S. caripense* (5) la menos relacionada de todas, esto por la alta diversidad de genotipos que presento y la proporción 0.25:1 de A1:A2 y resistente a metalaxil

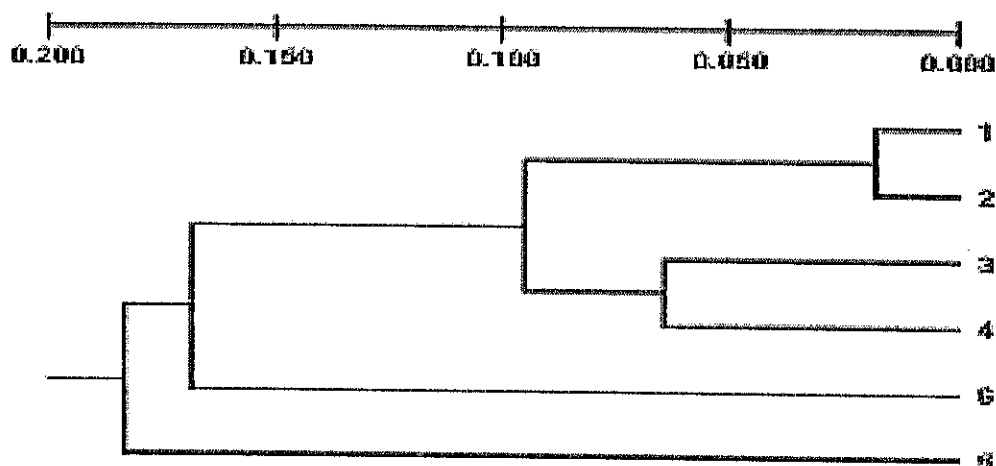


Figura 16. Dendrograma basado en el análisis de UPGMA de las poblaciones de *P. infestans* aisladas de *S. phureja* (1), *S. acaule* (2), *S. bulbocastanum* (3), *S. andreanum* (4), *S. caripense* (5) y *S. muricatum* (6).

4.5. Discusión general.

Se tuvieron varios clones de *S. phureja* y *S. acaule* en el campo, que mostraron diversos grados de severidad de infección entre individuos de un mismo clon, lo cual es típico de las especies silvestres independientemente de su nivel de resistencia al patógeno (Lozoya-Saldaña *et al.*, 1997). El resto de las especies si mostró su resistencia

característica, con limitado número de lesiones, pero suficientes para obtener los aislamientos.

Aún cuando las proporciones de los grupos de compatibilidad fueron iguales al contabilizar la totalidad de la población, en los casos de *S. bulbocastanum* y *S. muricatum*, solo fueron infectados por el grupo A1, lo que hace de estas especies potenciales progenitores para mejoramiento genético para resistencia a las variantes agresivas A2 del oomiceto. Las diferencias de ploidía entre *S. bulbocastanum* ($2X = 24$) y *S. tuberosum* ($4X = 48$) han sido superadas mediante la fusión de protoplastos, con resultados exitosos (Helgeson *et al.*, 1997). *S. muricatum*, por otro lado, es una especie no tuberosa domesticada en Sudamérica, conocida como pepino dulce (Spire y Rouselle, 1999), que no es hospedero importante de *P. infestans*, cuyo cultivo es por su fruto y no se le incluye en los programas de mejoramiento genético de papa. El inconveniente de esta especie para fitomejoramiento es que algunas cepas de *P. infestans* que la infectaron resultaron resistentes a metalaxil.

Aunque *S. phureja* y *S. acaule* han sido reportadas como resistentes a *P. infestans* en Sudamérica (Hawkes, 1994), en la región del Valle de Toluca estas especies fueron muy susceptibles al patógeno al ser sometidas de manera natural a una mayor presión del oomiceto, y altamente resistentes a metalaxil, por lo que no sería recomendable usarlas en los programas de mejoramiento genético.

El genotipos multilocus A2 100/100 en *Gpi* y 100/100 en *Pep* predomino en los aislamientos de *P. infestans* obtenidos de *S. phureja* y *S. acaule*, siendo también el genotipo mas común en la región del Valle de Toluca (Grünwald *et al.*, 2001). Un aislamiento de *S. phureja* y todos los aislamientos de *S. muricatum* (Cuadro 7) corresponden al genotipo norteamericano US-1, considerado como el genotipo extraído de México en 1840s y diseminado alrededor del mundo (Goodwin *et al.*, 1994 a., Goodwin *et al.*, 1994 b). El genotipo A2 100/111/122 para *Gpi* y 100/100 en *Pep* identificado como US-8, considerado como uno de los más agresivos en Norteamérica y muy común en el norte de México (Goodwin *et al.*, 1995 a) fue detectado en un aislamiento de *S. phureja*. Los genotipos dominantes en la población total del oomiceto para *Gpi* fue 86/100, coincidiendo con lo reportado por Tooley *et al.* (1985), Grünwald *et al.* (2001) y Guzmán-Galindo (2002), en tanto que en *Pep* el más común fue el 100/100 concordando con Grünwald *et al.* (2001), Lozoya-Saldaña *et al.* (2002) y Guzmán-Galindo (2002).

El numero elevado de genotipos encontrados en la población total y en los aislamientos obtenidos de *S. phureja*, *S. acaule*, *S. caripense* revelan el origen sexual de la población del oomiceto en el Valle de Toluca.

La resistencia a metalaxil fue elevada en *S. phureja*, *S. acaule*, *S. caripense* y *S. muricatum*, concentrándose esta en aislamientos homotáticos, A2 y en menor proporción A1, coincidiendo con lo reportado por Deahl *et al.* (1995), pero no con Hermansen *et al.* (2000) quienes encontraron una mayor resistencia a metalaxil en aislamientos A1. En *S. bulbocastanum* y *S. andreanum* que fueron todos susceptibles a metalaxil y del grupo

de compatibilidad A1. La resistencia a metalaxil de la población en general a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ coincide con Matuszak *et al.* (1994), pero no con Guzmán-Galindo (2002) quien a esta misma concentración no encontró crecimientos mayores a 60 % respecto al testigo.

Los clones de *Solanum* han sido agrupado en base a su similitud encontrada en los aislamientos de *P. infestans*. *S. phureja* ($2X = 24$) y *S. acaule* ($4X = 48$) fueron clones muy similares al ser susceptibles al oomiceto (Figura 1 y 2) con aislamientos resistentes a metalaxil y de origen sexual; *S. bulbocastanum* ($2X = 24$) de origen mexicano y *S. andreanum*, de origen sudamericano, fueron dos especies similares entre si, resistentes a *P. infestans*, con aislamientos susceptibles a metalaxil y del grupo de compatibilidad A1. En tanto que *S. caripense* y *S. muricatum*, ambas sudamericanas, con resistencia a *P. infestans*, presentaron aislamientos resistentes a metalaxil y fueron los clones con menor grado de similitud con respecto al resto de las especies evaluadas.

CONCLUSIONES

- 1.- La resistencia contra *P. infestans* no se conserva en *S. phureja* y *S. acaule*, pero sí en *S. andeanum*, *S. muricatum*, *S. caripense* y *S. bulbocastanum*.
- 2.- Con excepción de *S. muricatum*, no se observó especificidad hospedero-patógeno.
- 3.- La población estudiada fue en su mayoría de origen sexual, al encontrarse una gran diversidad genética e igual proporción en los grupos de compatibilidad.
- 4.- Independientemente del hospedante de donde se obtuvieron las cepas, la mayor resistencia a metalaxil se observó en las homotáticas, seguidas de las A2.
- 5.- *S. bulbocastanum* y *S. andeanum* serían buenas fuentes de resistencia genética contra *P. infestans*, pues fueron resistentes al ataque del patógeno y solo fueron atacadas por cepas A1 con susceptibilidad a metalaxil.

LITERATURA CITADA

- Abad, Z. G., and J. A. Abad. 1997. Another look at the origin of late blight of potatoes, tomatoes, and pear melon in the Andes of South America. *Plant Dis.* 81: 682-688.
- Abad, Z. G., and J. A. Abad. 1995. Historical evidence on the occurrence of late blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America. In: *Phytophthora infestans* 150. L. J. Dowley, E. Bannion, L. R. Cooch, T. Keane & E. O'Sullivan. pp: 36-41.
- Agrios, N. G. 1998. Fitopatología. Limusa. México. 838 p.
- Alexopoulos, C. J., y C. W. Mims. 1979. Introductory Mycology. John Wiley & Sons. 632 p.
- Castro Franco, J. 1962. Observación sobre la variación asexual en *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Tesis. Parasitología Agrícola. UACH. México. 37 p.
- Davidse, L. C., D. L. Danial., and C. J. Van Westen. 1983. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Neth. J. Pl. Path.* 89:1-20.
- Deahl, K. L. DeMuth, S. P., and A. Rivera-Peña. 1995. Identification of mating types and metalaxyl resistance in North American population of *Phytophthora infestans*. *Am. Potato J.* 72:35-49.

- Erselius, L. J., Vega-Sánchez, 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.
- Erwin, D. C., y O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. St. Paul Minnesota. U. S. A., The American Phytopathological Society 562 p.
- Ferreira, M. E. y D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasil. 220 p.
- Flier, W. G., Grünwald, N. J., Kroon, L. P. N. M., Sturbaum, A. K., van de Bosch, T. B. M., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldaña, H., Fry, W. E., and Turkensteen, L. J. 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of central México suggests genetic differentiation between population from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology* 93:382-390.
- Flier, W. E., Grünwald, N. J., Kroon, P. N. M., Van den Bosh, B. M., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldaña, H., Bonants, P. J. M., and Turkensteen, L. J. 2002. *Phytophthora ipomoea* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Ipomoea longipendiculata* in the Toluca Valley of central México. *Mycol. Res.* 106:848-856.
- Flores, C. R. 1969. Taxonomía, distribución y potencial de los *Solanum* tuberíferos silvestres de México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, SAG, México. 33 p.

- Fry, W. E., S. B. Goodwin., J. M. Matuszak., L.J. Spielman., and M. G. Milgroom. 1992. Population genetics and intercontinental migration of *Phytophthora infestans*. Annu. Rev. Phytopathol. 30: 107-129.
- Gallegly, M. E., and J. A. Galindo. 1958. Mating types and oosporas of *Phytophthora infestans* in nature in México. Phytopathology 48: 274-276.
- Gallegly, M. E. 1968. Genetics of pathogenicity of *Phytophthora infestans*. Annu. Rev. Phytopathol. 6:375-396.
- Garay, S. E. 2001. Estructura genética de la población de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en el Valle de Toluca, México. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de México. 39 p.
- Gisi, U., and Y. Cohen. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. Annu. Rev. Phytopathol. 34:549-572.
- Goodwin, S. B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. Phytopathology 87:462-473.
- Goodwin, S. B., Sujkowski, L. S., Dyer, A. T., Fry, B., and W. Fry. 1995 a. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North America. Phytopathology 85:473-479.

- Goodwin, S. B., Schneider, R. E., and W. E. Fry. 1995 b. Use of cellulose-acetate electrophoresis for rapid identification of alloenzyme genotypes of *Phytophthora infestans*. Plant Dis. 79:1181-1185.
- Goodwin, S. B. 1996. Origin and Ecology of *Phytophthora infestans*. Rev. Méx. de Fitopatología 14:143-147.
- Goodwin, S. B. s/a. The theory of isozymes: why dimeric enzymes in diploids give multiple-banded phenotypes when heterozygous. Sin publicar. 5 p.
- Goodwin, S. B., Cohen, B. A., Deahl, K. L., and Fry, W. E. 1994 a. Migration from northern México as the probable cause of recent genetic changes in populations of *Phytophthora infestans* in the United State and Canada. Phytopathology 84:553-558.
- Goodwin, S. B., Cohen, B. A., and W. E. Fry. 1994 b. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:11591-11595.
- Griffith, G. W., and D. S. Shaw. 1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: for mitochondrial haplotypes are detected after PCR application of DNA from pure culture or from host lesions. Appl. Env. Microbiol. 64:4007-4014.

- Grünwald, N. J., Flier, W. C., Strurbaum, A. K., Garay-Serrano, E., van de Bosch, T. B. M., Smart, C. D., Matuszak, J. M., Lozoya-Saldaña, H., Turkensteen, L. J., and Fry, W. E. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central México. *Phytopathology* 91:882-890.
- Gullino, M. L., Kuijpers, L. A. M. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:559-579.
- Guzmán-Galindo, L. 2002. Caracterización de *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary y evaluación de los componentes de resistencia en variedades de papa (*Solanum tuberosum*). Tesis de Maestría. Parasitología Agrícola. UACH. México. 70 p.
- Hawkes, J. G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationship. In: *Potato Genetics*. Bradshaw, J. E., and G. R. Mackay. Cab International. U. K. pp: 3-42.
- Helgelson, J. P., Haberlach, G. T., McGrath, J. M., Raasch, J. A., Naess, S. K., and Wielgus, S. M. 1997. A RAPD marker linked to late blight resistance derived from *Solanum bulbocastanum*-potato somatic hybrids. 81 Annual Meeting of the Potato Association of America, Prince Edward Island. Canada.
- Henfling, J. W. 1987. Late blight of potato. Technical information bulletin 4. International Potato Center (CIP). Lima Perú. 25 p.

- Hermansen, A., Hannukkala, A., Hafskjold Naerstad, R., and M. B. Brurberg. 2000. Variation in population of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. *Plant Pathology* 49:11-22.
- Kadish, D., Grinberger, M., and Y. Cohen. 1990. Fitness of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* on susceptible and resistant potato cultivars. *Phytopathology* 80:200-205.
- López, L. J. 1991. De la papa a la patata: la difusión española del tubérculo andino. Lunwer, España. 213 p.
- 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.
- Lozoya-Saldaña, H., Hernández, A., Flores, R., and Bamberg, J. 1997. Late blight on wild *Solanum* species in the Toluca Valley in 1996. 81 Annual Meeting of the Potato Association of America, Prince Edward Island. Canada.
- Matuszak, J. M., Fernández-Elquezabal, J., Gu, W. K., Villareal-González, M., and W. E. Fry. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* population to metalaxyl in México: Distribution and dynamics. *Plant Dis.* 78:911-916.

Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analysis (TPFGA). A windows program for the analysis of alloenzyme and molecular population genetic data. Computer software distributed; version 1.3. Northern Arizona University. Arizona, USA.

Niederhauser, J. S. 1991. *Phytophthora infestans*, the Mexican connection. In: Symposium of the British Micological Society, the British Society for Plant Pathology, and the Society of Irish Plant Pathologist. Lucas, J. A., R. C. Shattock., D. S. Shaw., and L. R. Cooke. Cambridge University Press. United Kingdom. 447 p.

Niederhauser, J. 1956. The blight, the blighter, and the blighted. The New York Academy of Sciences 19:55-63.

Patterson, D. J., and Sogin, M. L. 2000.
<http://phylogeny.arizona.edu/tree/eukaryotes/eukariotes.html>

Peters, R. D., Platt (Bud), H. W., Driscoll, A., MacPhail, A., Jenkins, S., Medina, M., Connors, E., Maxwell, P. W., MacLean, V., and Hall, R. 1997. Characterization of rapidly changing population of *Phytophthora infestans* in Canada-1996. Agri-Info. Charlottetown Research Centre-Potato Program. Canada. 5 p.

Peters, R. D., (Bud) Platt, H. W., and R. Hall. 1998. Characterization of change in population of *Phytophthora infestans* in Canada using mating type and metalaxyl sensitivity markers. Can. J. Plant Pathol. 20:259-273.

- Ragsdale, N. N., Sisler, H. D. 1994. Social and political of managing plant diseases with decreased availability of fungicides in the United States. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:545-557.
- Reddick, D., Mills, W. 1938. Building up virulence in *Phytophthora infestans*. *Am. Potato J.* 15:29-34.
- Reddick, D. 1939. When came *Phytophthora infestans*?. *Cronica Botanica* 5: 410-412.
- Ristaino, J. B., Groves, C. T. & Parra, G. R. 2001. PCR Amplification of the Irish Potato Famine Pathogen from Historic Specimen. *Nature* 411:695-697.
- Romero, C. S. 1993. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, México. 347 p.
- Romero, C. S. 1958. Estudios preliminares del “estado sexual” del *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary en México. Tesis. Parasitología Agrícola. ENA. 49 p.
- Shattock, R. C. 1998. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol.* 37:4-11.
- Smart, C. D., H. Mayton., E. S. G. Mizubuti., M. R. Williams., and W. E. Fry. 2000. Enviromental and genetic factors influencing self-fertility in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 90:987-994.

- Smoot, J. J., f. J. Gouch., H. A. Lameu., J. J. Eichenmuller, and M. E. Gallegly. 1958. Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 48: 165-171.
- Sozzi, D, and T. Staub. 1987. Accuracy of methods to monitor sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenilamide fungicides. *Plant Dis.* 71: 422-425.
- Spielman, L. J., A. Drenth., L. C. Davidse., L. J. Sujkowskis., W. Gu., P. W. Tooley., and W. E. Fry. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*?. *Plant Pathol.* 40:422-430.
- Spire, D. C., y P. Rousselle. 1999. Origen sociohistorico. In: La patata. Rousselle, P., Robert, Y., y J. C. Crosnier. Mundi Prensa, España. pp: 46-72.
- Tooley, P. W., Fry, W. E., and Villareal, G. M. J. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* population. *The Journal of Heredity* 76:431-435.
- Towner, K. J., and A. Cockayne. 1993. Molecular methods for microbial identification and typing. Chapman & Hall. U. K. 202 p.
- Valadez, E., y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa, S. A. de C. V. México. 147 p.

VII. APÉNDICE

Cuadro 1. Frecuencia de los alelos más comunes de glucosa-fosfato-isomerasa (*Gpi*) y peptidasa (*Pep*) por localidad y año de colección (Fry *et al.*, 1992)

COLECCIÓN	ALELO <i>Gpi</i>						ALELO <i>Pep</i>		
	83 0.01	86 0.23	90 0.02	100 0.55	122 0.17	130 0.01	83 0.01	92 0.15	(96)-100 0.84
Centro de México 1983-1989 (n= 125) A1:A2= 1:1									
Europa antes de 1980									
Holanda 1951-1978 (n= 7) A1:A2= 1:0	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0.35	0.65
Gales 1978 (n=9) A1:A2= 1:0	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0.5	0.5
Europa después de 1980									
Irlanda 1989 (n=25) A1:A2= 8:2	0	0	0.26	0.74	0	0	0.08	0	0.92
Holanda 1989 (n=205) A1:A2= 9:1	0	0	0.41	0.59	0	0	0.21	0	0.79
Polonia 1989 (n=4) A1:A2= 5:5	0	0	0.36	0.64	0	0	0.06	0	0.94
Gales 1987 (n=9) A1:A2= 6:4	0	0	0.23	0.77	0	0	0.22	0	0.78
Japón 1958-1983 (n=4) A1:A2= 1:0	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0.25	0.75
Japón 1987-1990 (n=198) A1:A2= 4:6	0	0.17	0	0.83	0	0	0	0.18	0.82
Perú 1984-1986 (n=25) A1:A2= 1:0	0	0.5	0	0.5	0	0	0	0.48	0.52
USA/Canada 1979-1989 (n=70) A1:A2= 1:0	0	0.4	0	0.6	0	0	0	0.47	0.53

Cuadro 2. Características de los genotipos norteamericanos usados como referencias en la determinación de los alelos para las isoenzimas *Pep* y *Gpi* (Goodwin *et al.*, 1995).

Genotipo	Gpo. compatibilidad	Patrones isoenzimáticos		
		<i>Gpi</i>	<i>Pep</i>	Respuesta a metalaxyl
US-1	A1	86/100	92/100	Sensible
US-6	A1	100/100	92/100	Resistente
US-7	A2	100/111	100/100	Resistente
US-8	A2	100/111/122	100/100	Resistente

Cuadro 3. Reactivos utilizados en la tinción de *Gpi*.

Cantidad	Reactivo
1.5 Ml	Tris HCl 0.05M pH 8.0
5 gotas	D-Fructuosa-6-fosfato
1 mL	2-Nicotianamide Adenina Dinucleótidos (NAD)
5 gotas	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)
5 gotas	Phenazine Methosulfato (PMS)
10 µL	Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa
2 mL	Agar al 1.6 %

Cuadro 4. Reactivos utilizados en la tinción de *Pep*.

Cantidad	Reactivo
2 mL	Tris HCl 0.05M pH 8.0
10 gotas	Glicil leucina
5 gotas	Peroxidasa
8 gotas	O-Dianisidina
2 gotas	MgCl ₂
5 gotas	L-amino acido oxidasa
2 mL	Agar al 1.6 %

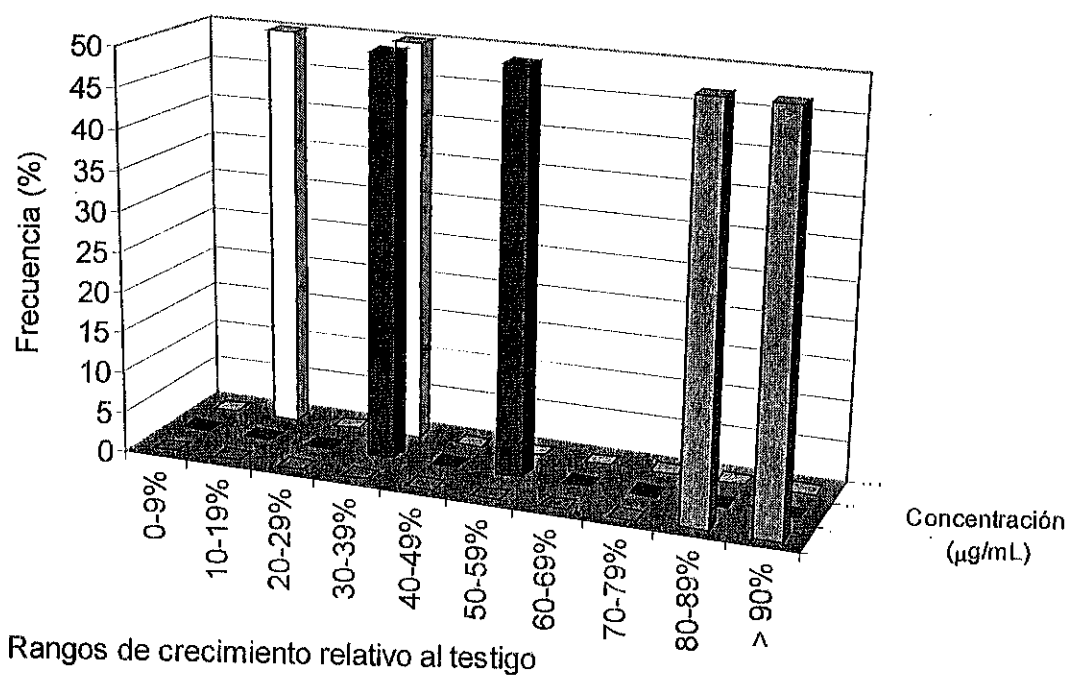


Figura 1. Distribución de la frecuencia de aislamientos en rangos de crecimiento relativo de los aislamientos procedentes de *Solanum andreanum*.

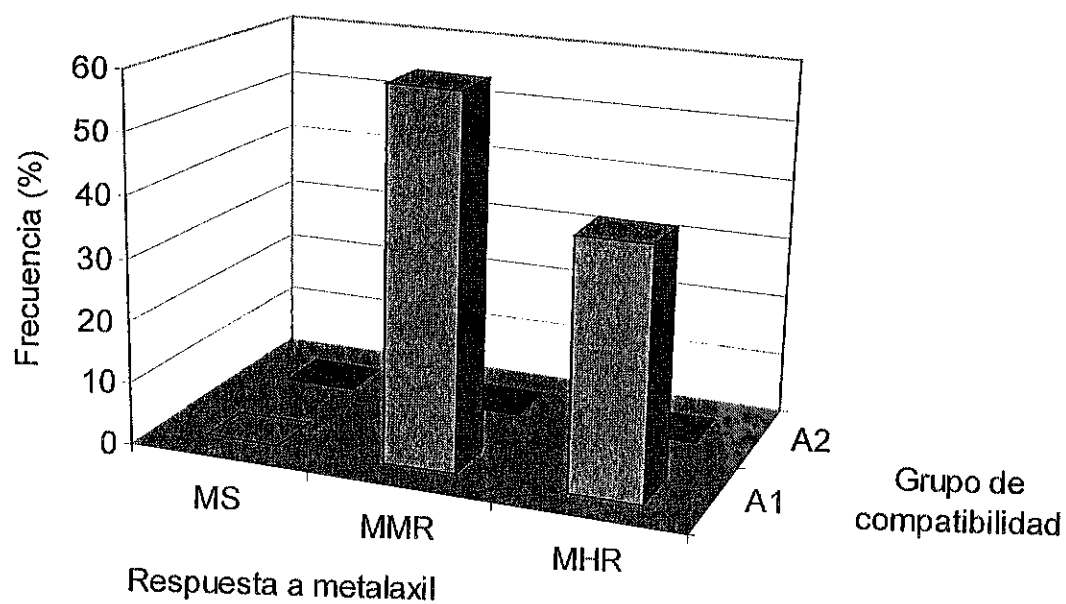


Figura 2. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Solanum muricatum*. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).

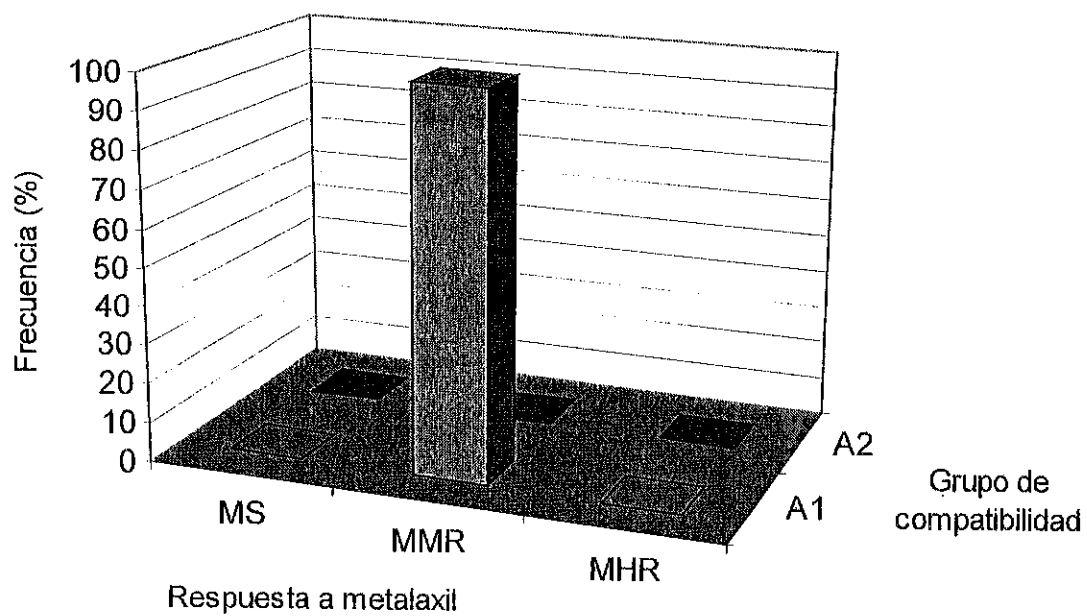


Figura 3. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Solanum bulbocastanum*. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).

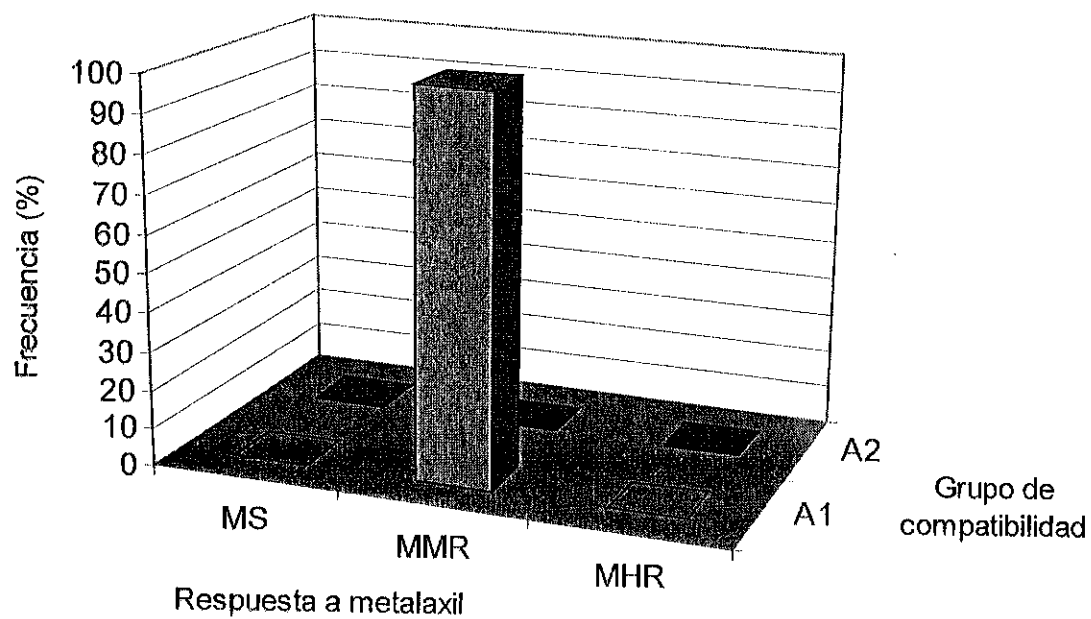


Figura 4. Relación entre Grupo de Compatibilidad (G.C.) y respuesta a metalaxil a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *Solanum andreanum*. MS (susceptible a metalaxil), MMR (moderadamente resistente a metalaxil), MHR (altamente resistente a metalaxil).

Cuadro 5. Análisis UPGMA usando las distancias originales de Nei's (1972), de los aislamientos de *S. phureja*, *S. acaule*, *S. bulbocastanum*, *S. andreanum*, *S. caripense* y *S. muricatum*.

Punto	Distancia genética (coeficiente de similitud)	
1	0.0183	Intersección <i>S. phureja</i> - <i>S. acaule</i>
2	0.0638	Intersección <i>S. bulbocastanum</i> - <i>S. andreanum</i>
3	0.0949	Intersección <i>S. phureja</i> - <i>S. acaule</i> - <i>S. bulbocastanum</i> - <i>S. andreanum</i>
4	0.1684	Intersección <i>S. muricatum</i> - <i>S. phureja</i> - <i>S. acaule</i> - <i>S. bulbocastanum</i> - <i>S. andreanum</i>
5	0.1835	Intersección <i>S. caripense</i> con todas las anteriores

Cuadro 6. Distancia de identidad de los aislamientos obtenidos de *S. phureja*, *S. acaule*, *S. bulbocastanum*, *S. andreanum*, *S. caripense* y *S. muricatum*, en base a la prueba de Nei's (1972/1978).

Comparación	Índice de identidad
<i>S. phureja</i> vs <i>S. acaule</i>	0.9819
<i>S. phureja</i> vs <i>S. bulbocastanum</i>	0.8795
<i>S. phureja</i> vs <i>S. andreanum</i>	0.9126
<i>S. phureja</i> vs <i>S. caripense</i>	0.9366
<i>S. phureja</i> vs <i>S. muricatum</i>	0.8583
<i>S. acaule</i> vs <i>S. bulbocastanum</i>	0.9019
<i>S. acaule</i> vs <i>S. andreanum</i>	0.9452
<i>S. acaule</i> vs <i>S. caripense</i>	0.8595
<i>S. acaule</i> vs <i>S. muricatum</i>	0.8232
<i>S. bulbocastanum</i> vs <i>S. andreanum</i>	0.9382
<i>S. bulbocastanum</i> vs <i>S. caripense</i>	0.7947
<i>S. bulbocastanum</i> vs <i>S. muricatum</i>	0.8333
<i>S. andreanum</i> vs <i>S. caripense</i>	0.7682
<i>S. andreanum</i> vs <i>S. muricatum</i>	0.8660
<i>S. caripense</i> vs <i>S. muricatum</i>	0.8131