

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**VARIABILIDAD INTERESPECÍFICA ENTRE ESPECIES
MEXICANAS DE *Phytophthora* DEL CLADO 1C**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Presenta:

MERCEDES MARÍA CUENCA CONDOY

Bajo la supervisión de: HÉCTOR LOZOYA SALDAÑA PH. D.



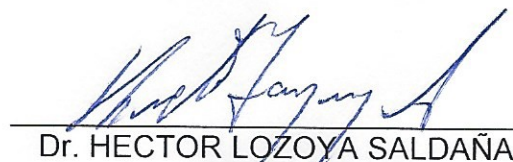
Chapingo, Estado de México, mayo de 2018

**VARIABILIDAD INTERESPECÍFICA ENTRE ESPECIES MEXICANAS DE
Phytophthora DEL CLADO 1C**

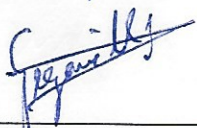
Tesis realizada por **Mercedes María Cuenca Condoy** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

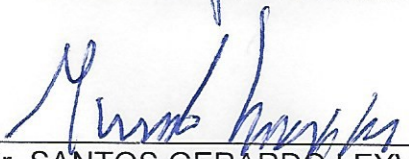
PRESIDENTE:


Dr. HECTOR LOZOYA SALDAÑA

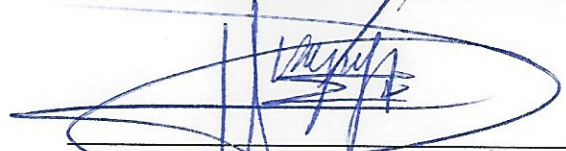
ASESOR:


Dr. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

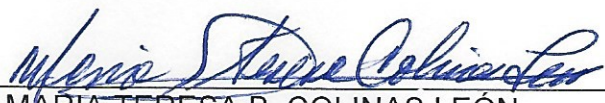
ASESOR:


Dr. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESOR:


Dr. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR:


Dra. MARÍA TERESA B. COLINAS LEÓN

LECTOR EXTERNO


Dra. SYLVIA PATRICIA FERNÁNDEZ PAVIA

DEDICATORIA

A Dios, fuente de toda sabiduría y poder

A mis hijos Samantha y Jonathan

A mi esposo

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para los estudios de doctorado. Mi gratitud a los profesores investigadores y personal administrativo del Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña por la guía, el apoyo y la amistad recibida durante este periodo. Asimismo, mi agradecimiento a los miembros del comité asesor: Dra. Ma. Teresa Colinas León, Dr. Juan Porfirio Legaria Solano, Dr. Santos Gerardo Leyva Mir y Dr. Mateo Vargas Hernández por el apoyo y las valiosas aportaciones para la ejecución de las actividades involucradas en el desarrollo de este proyecto; a la Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavia (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) por su colaboración en calidad de lectora externa del informe final.

Al Dr. Juan Martínez Solís Coordinador del Posgrado en Horticultura, por la constante disposición y orientación en asuntos administrativos; al Ing. Cecilio Bautista responsable del laboratorio de Usos Múltiples, por su apoyo profesional.

Mis sinceros agradecimientos a mis compañeros de generación y a las personas con quienes coincidí en tiempo y espacio en las aulas, laboratorios, congresos, cubículos, en el campo; su profesionalismo, amistad y cordialidad le ha dado un valor agregado a este tiempo de formación.

DATOS BIOGRÁFICOS



Mercedes María Cuenca Condoy nació en Loja (Ecuador), naturalizada mexicana, cuenta con un bachillerato en Físico-Matemáticas del Instituto Técnico Superior “Daniel Álvarez Burneo”; se inclinó por la Ingeniería Agropecuaria obteniendo el título en 2007 otorgado por la Escuela Politécnica del Ejército (Sangolquí, Ecuador). Los estudios de posgrado los realizó en la Universidad Autónoma Chapingo (Texcoco-México). En 2010 la Maestría en Protección Vegetal y en 2018 el Doctorado en Horticultura. En el ejercicio profesional ha desarrollado análisis de riesgos de plagas para importaciones, manejo de personal como jefa de cultivo del rosal, cuenta además con experiencia en laboratorio de fitopatología y docencia. Continúa vinculada a la red de expertos en laboratorios, diagnóstico vegetal de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD).

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DATOS BIOGRÁFICOS.....	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN GENERAL	x
GENERAL ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS.....	3
ORGANIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	4
LITERATURA CITADA	4
CAPÍTULO I. SINÓPSIS DEL CLADO 1C DEL GÉNERO <i>Phytophthora</i>.....	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
1.4. ASPECTOS BIOLÓGICOS	10
1.4.1. Centro de origen de las especies del clado 1c del género <i>Phytophthora</i>	10
1.4.2. <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary: Tizón tardío de la papa...	11
1.5. ASPECTOS EVOLUTIVOS	18
1.5.1. Genoma de <i>P. infestans</i> (Mont.) de Bary	18
1.5.2. ¿Por qué es tan grande el genoma de las especies del clado 1c? ..	19
1.5.3. Coevolución del parasitismo de <i>P. infestans</i> con el género <i>Solanum</i>	21
1.5.4. La hibridación interespecífica	24
1.5.5. Resistencia al metalaxil	25
1.6. ASPECTOS POBLACIONALES (CARACTERIZACIÓN).....	26
1.6.1. Caracterización fenotípica	26
1.6.2. Marcadores Bioquímicos de proteínas: Glucosa fosfato isomerasa (GPI) y Peptidasa (PEP).....	27
1.6.3. Marcadores moleculares	27

1.6.4. Secuenciación	28
1.6.5. Análisis Filogenético.....	29
1.6. LITERATURA CITADA.....	31
CAPÍTULO II. VARIABILIDAD DE LA RESISTENCIA AL METALAXIL DE LAS ESPECIES MEXICANAS DEL CLADO 1C DEL GÉNERO <i>Phytophthora</i>.....	36
Abstract.....	37
Resumen	37
Introducción.....	37
Materiales y métodos.....	38
Muestreo	38
Obtención de los aislamientos.....	39
Resistencia in vitro al metalaxil	39
Análisis de concentración efectiva media (CE ₅₀).....	41
Extracción de ADN	41
Amplificación y secuenciación de la región que codifica la subunidad RPA 190.....	41
Alineamiento de secuencias.....	41
Análisis Filogenéticos	41
Resultados y discusión	42
Porcentaje de crecimiento en diferentes concentraciones	42
Categorías de resistencia de <i>P. infestans</i> a metalaxil.....	42
Concentración efectiva media (CE ₅₀)	43
Análisis filogenético	44
Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)	44
Conclusiones.....	48
Literatura citada	49
CAPÍTULO III. PRIMER REPORTE DE <i>Phytophthora ipomoeae</i> OCASIONANDO TIZÓN TARDÍO EN HOJAS DE PAPA EN EL CENTRO DE MÉXICO.....	51
References	53
ANEXO 1. PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE <i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> (Mont.) de Bary, DE SÍNTOMAS DE TIZÓN TARDÍO EN PAPA (<i>Solanum tuberosum</i>).....	54
ANEXO 2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR-CENTENO	59

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Detalle de los aislamientos caracterizados del estudio.....	39
Cuadro 2. Polimorfismos en el fragmento <i>RPA190</i>	46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Relaciones filogenéticas entre los cinco reinos de eucariotas	13
Figura 2. Síntoma de tizón tardío en papa en el Valle de Toluca	14
Figura 3. Esquema de la patogénesis de <i>P. infestans</i> en el Valle de Toluca (adaptado de Agrios, 2005)	16
Figura 4. Características principales de los genomas secuenciados de los fitopatógenos filamentosos	20
Figura 5. Inmunidad innata de la planta.....	22
Figura 6. Árbol evolutivo de las especies del género <i>Phytophthora</i>	30

CAPÍTULO II

Figura 1. Sitios de muestreo	38
Figura 2. Aislamiento de <i>P. infestans</i>	40
Figura 3. Crecimiento de <i>P. infestans</i> en medio selectivo de agar-centeno.	40
Figura 4. Síntomas de tizón en <i>M. jalapa</i>	40
Figura 5. Histogramas del porcentaje de crecimiento.....	42
Figura 6. Categorías de resistencia al metalaxil por localidades.....	43
Figura 7. Histograma del logaritmo de CE ₅₀ de metalaxil	44
Figura 8. Análisis filogenético basado en la secuencia de nucleótidos <i>RPA 190</i> , estilo tradicional rectangular, método UPGMA.	45
Figura 9. Análisis filogenético basado en la secuencia de nucleótidos <i>RPA 190</i> , estilo radial, método UPGMA	46
Figura 10. Análisis filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de <i>RPA 190</i> , estilo tradicional rectangular método UPGMA.	47
Figura 11. Análisis filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de <i>RPA 190</i> , estilo radial método UPGMA.	48

ANEXO I

Figura 1. Síntoma de tizón tardío en papa en el Valle de Toluca.	54
Figura 2. Esquema de cámara húmeda para el aislamiento de <i>P. infestans</i>	56
Figura 3. Esporulación en cámara húmeda entre 24 a 36 horas.....	56
Figura 4. Inoculación de rodaja de papa.....	57

RESUMEN GENERAL

VARIABILIDAD INTERESPECÍFICA ENTRE ESPECIES MEXICANAS DE *Phytophthora* DEL CLADO 1C

A nivel mundial *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío, es el patógeno más destructivo en el cultivo de papa. Está relacionado genéticamente con: *P. phaseoli*, *P. ipomoeae*, *P. mirabilis* y *P. andina* (clado 1c). La presencia de *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* en el altiplano central mexicano obedece a una evolución simpátrica, la especiación pudo haberse originado por el salto de hospedero, seguido de una especialización a través de mutaciones de los genes efectores del patógeno. La resistencia del patógeno al metalaxil se ha asociado con una mutación en la subunidad larga de la *ARN poll*. Considerando los impactos continuos y negativos de *P. infestans*, entender su biología y la de las especies *P. mirabilis* y *P. ipomoeae*, es imperativo para establecer nuevas estrategias de manejo. El objetivo del presente trabajo fue determinar la variabilidad fenotípica y genotípica de la resistencia a metalaxil de *P. infestans* y *P. mirabilis* en diferentes localidades del altiplano mexicano. Para lo anterior se caracterizaron poblaciones del patógeno de los estados de Tlaxcala, Michoacán, Puebla y Estado de México. La diversidad fenotípica se evaluó con la resistencia *in vitro* al metalaxil y la diversidad genética con los polimorfismos del gen que codifica para la subunidad *RPA 190* de la *ARN poll*. En Toluca (propuesto como el centro de origen del clado 1c) existió menor frecuencia de aislamientos resistentes al metalaxil. Un polimorfismo de un solo nucleótido, *SNP 602 GT*, tuvo 62 % de asociación con aislamientos resistentes. La distancia genética entre las especies *P. infestans* y *P. mirabilis* fue 0.006144 (*p-distance*). Se encontró salto de hospedero de *P. ipomoeae* ocasionando tizón tardío en papa (*Solanum tuberosum*) en Chapingo y Villarreal. Se concluye que la variabilidad que existe en las localidades cercanas a Toluca, definen mayor amplitud del centro de origen.

Palabras clave: Clado 1C de *Phytophthora*; *P. infestans*; *P. mirabilis*; *P. ipomoeae*; salto de hospedero; *RPA 190*; resistencia al metalaxil.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Mercedes María Cuenca Condoy

Director: Dr. Héctor Lozoya Saldaña

GENERAL ABSTRACT

INTERSPECIFIC VARIABILITY IN MEXICAN *Phytophthora* CLADE 1C SPECIES

Phytophthora infestans, the causal agent of potato late blight, is one of the most destructive plant pathogens of potato globally. Genetically, the pathogen is closely related to four other *Phytophthora* species (clade 1c): *P. phaseoli*, *P. ipomoeae*, *P. mirabilis*, and *P. andina*. Sympatric evolution of three of the species (*P. infestans*, *P. mirabilis* and *P. ipomoeae*) found in the highlands of central Mexico has occurred. Host jumps followed by host specialization through mutations of effector genes may be driving speciation in the clade. A mutation in the large subunit of RNA polI contributed to the resistance of *P. infestans* to metalaxyl. To effectively manage the disease, it is very important to know the biology of the clade 1c. The objective of the present study was to determine the phenotypic and genotypic variability in the resistance of *P. infestans* and *P. mirabilis* to metalaxil in the highlands of central Mexico. A characterization study was conducted with the isolates from Tlaxcala, Michoacán, Puebla and the State of México. Metalaxyl resistance determined phenotypic diversity, while genotypic variability was assessed using polymorphisms in the RPA190 gene encoding the large subunit of RNA polI. The frequency of resistant isolates in the Toluca Valley (it has been proposed as the center of origin of the entire 1c clade) was the lowest. A single nucleotide polymorphism (SNP 602 GT) was present in 62 % of the resistant isolates. The genetic distance between *P. infestans* and *P. mirabilis* was 0.006144 (*p-distance*). Host jump in *P. ipomoeae* causing late blight in potato foliage in Chapingo and Villarreal was found. These results conclude that the center of origin is larger than previously established.

Keywords: *Phytophthora* 1c clade; *P. infestans*; *P. mirabilis*; *P. ipomoeae*; host jump; RPA 190; metalaxyl resistance.

Ph. D. Thesis in Horticultural Sciences, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Mercedes María Cuenca Condoy

Advisor: Dr. Héctor Lozoya Saldaña

INTRODUCCIÓN GENERAL

El tizón tardío es la enfermedad más devastadora de la papa (*Solanum tuberosum*) presentando una distribución mundial. Se estima que esta enfermedad, genera pérdidas anuales en la producción del cultivo de 4800 millones de euros (€) (Wang et al., 2017). Ninguna otra enfermedad de plantas ha causado tan amplia dispersión humana e impacto social (Erwin y Ribeiro, 1996). Históricamente el daño más grave ocurrió, sin duda, en el año de 1845 en Irlanda. La enfermedad destruyó en su totalidad los campos de papa, ocasionando hambruna, muerte a miles de personas y la migración de muchos sobrevivientes a otros lugares de Europa y América del Norte (Agrios, 2005). El patógeno, *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, ingresó a Europa en 1840, en materiales de papa importados de América del Norte y América del Sur; como respuesta a la degeneración del material de propagación existente en Europa en aquella época (Wang et al., 2017).

P. infestans se relaciona genéticamente con otras cuatro especies de *Phytophthora*: *P. phaseoli*, *P. ipomoeae*, *P. mirabilis* y *P. andina* (Kroon, Brouwer, de Cock y Govers, 2012), patógenos importantes en otras plantas cultivadas y silvestres (Forbes et al., 2013). Se han realizado estudios para aclarar la relación evolutiva de las especies dentro del clado, con genealogías que involucran desde un gen y varios genes hasta la secuenciación de todo el genoma nuclear y el genoma mitocondrial (Hass et al., 2009; Blair, Coffey y Marin, 2012; Gómez-Alpizar, Hu, Oliva, Forbes y Ristaino, 2017, Lassiter et al., 2015).

P. infestans y sus cuatro especies hermanas se encuentra en el clado 1c (Kroon et al., 2012). *P. phaseoli* se reportó por primera vez en Estados Unidos (Lassiter et al., 2015), su centro de origen es desconocido (Farr y Rossman, 2014), se ha

reportado en México, América Central y América del Sur, atacando a *Phaseolus limensis*, *P. lunatus*, y *P. vulgaris* (Lassiter et al., 2015). *P. mirabilis*, ocasiona tizón en *Mirabilis jalapa* (Galindo y Hohl, 1985) y *P. ipomoeae* en *Ipomoea orizabensis* e *I. purpurea* (Badillo-Ponce et al., 2004). *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* han sido reportadas sólo en México (Flier et al., 2002). Por otro lado, *P. andina* se ha reportado, únicamente, en Ecuador, Colombia y Perú, no en México (Forbes et al., 2013), esta especie es un híbrido entre *P. infestans* y una especie desconocida de *Phytophthora* (Lassiter et al., 2015). *P. infestans* y *P. andina* son especies simpátricas en los Andes y tienen hospederos comunes (Forbes et al., 2013).

La presencia de *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* en el altiplano central mexicano obedece a una evolución simpátrica, estas especies comparten características morfológicas (Grünwald y Flier, 2005). La especiación del clado pudo originarse por el salto de hospedero seguido de una especialización a través de mutaciones de los genes efectores del patógeno (Dong et al., 2014, Lassiter et al., 2015). Se ha propuesto al Valle de Toluca, como centro de origen las especies del clado 1c (Lassiter et al., 2015, Flier et al., 2002).

Considerando, que la fuerza evolutiva incrementa el *fitness* (incremento de agresividad, resistencia a fungicidas y alelos de virulencia) y el cambio de nicho de los patógenos (colonización de otros hospederos *host jump*); es necesario caracterizar las poblaciones del patógeno. La caracterización que se realiza en poblaciones del género *Phytophthora* puede ser fenotípica (tipo de apareamiento, virulencia/agresividad de razas y sensibilidad al metalaxil), bioquímica (isoenzimas: Glucosa-6-fosfato isomerasa y Peptidasa) y/o molecular (RFLPs nuclear y mitocondrial, PCR, secuenciación y microsatélites) (Martin, Abad, Balci e Ivors, 2012). Bajo este contexto introductorio, se enfatiza la importancia de caracterizar las poblaciones del clado 1c, del género *Phytophthora* de la parte central de México, con el propósito principal que las conclusiones de este estudio aporten al conocimiento de los fitopatógenos de este clado para contribuir en el desarrollo de estrategias efectivas de control.

OBJETIVOS

GENERAL

Contribuir al conocimiento de la variabilidad existente en las especies mexicanas del clado 1c del género *Phytophthora*, de manera que se aporte al entendimiento de las estrategias utilizadas por el patógeno: cambio de nicho de hospederos (*host jump*) y desarrollo de resistencia a metalaxil.

ESPECÍFICOS

Describir los aspectos relevantes conocidos, no conocidos y los controvertidos sobre el clado 1c del género *Phytophthora*, en base a las recomendaciones obtenidas en otros estudios de investigación (Capítulo 1).

Analizar la variación fenotípica *in vitro* de la resistencia al metalaxil y el gen que codifica para la subunidad *RPA 190* de la ARN polII de individuos de las especies *P. infestans* y *P. mirabilis* del clado 1c en diferentes localidades del altiplano mexicano (Capítulo 2).

Detectar cambio de hospederos de las especies mexicanas del clado 1c en las localidades del altiplano mexicano (Capítulo 3).

HIPÓTESIS

La variabilidad de las especies mexicanas *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* podría no estar restringida al Valle de Toluca, centro de origen del clado 1c. Geográficamente, la variabilidad puede ser más amplia, evidencias como la resistencia a metalaxil y el polimorfismo de la secuencia de ADN que codifica para la subunidad *RPA 190* lo sugieren.

ORGANIZACIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio está integrado por tres tipos de información de las especies mexicanas *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* (fenotipo de la resistencia *in vitro*, polimorfismos de la secuencia de ADN que codifica para la subunidad *RPA 190*, y el salto de hospederos).

El capítulo 1 corresponde a la revisión de literatura, integrada por tres aspectos relevantes del clado 1c: biológicos, evolutivos y poblacionales.

El capítulo 2 presenta la asociación entre la variación fenotípica *in vitro* de la resistencia al metalaxil y el gen que codifica para la subunidad *RPA 190* de la ARN polI de los individuos de las especies *P. infestans* y *P. mirabilis* del clado 1c. Se realizaron un análisis de concentración efectiva media (CE₅₀) y las categorías de resistencia, para determinar el fenotipo de la resistencia. Adicionalmente, se describe la variación molecular, a través de dendrogramas utilizando secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los individuos evaluados.

El capítulo 3, constituye el primer reporte de *P. ipomoeae* ocasionando tizón tardío en papa (*Solanum tuberosum*), en dos localidades del altiplano mexicano.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. USA: Elsevier Academic Press.
- Badillo-Ponce, G., Fernández-Pavía, S. P., Grunwald, N. J., Garay-Serrano, E., Rodríguez-Alvarado, G., Lozoya-Saldaña, H. (2004). First report of blight on *Ipomoeae purpurea* caused by *Phytophthora ipomoeae*. *Plant disease*, 88(11). 1283. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.11.1283C
- Blair, J.E., Coffey, M.D., Martin, F.N. (2012) Species tree estimation for the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, and close relatives. *PLoS ONE* 7(5), e37003. doi: 10.1371/journal.pone.0037003
- Dong, S., Stam, R., Cano, L. M., Song, J., Sklenar, J., Yoshida, K., Bozkurt, T. O., y Oliva, R. (2014). Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen. *Science* 343(6170), 552-555. doi: 10.1126/science.1246300

- Erwin, D.C. y Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. Minnesota, Estados Unidos: APS Press, American Phytopathological Society.
- Farr, D.F., Rossman, A.Y. (2014). *Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections*, ARS, USDA. Estados Unidos. Recuperado de https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/new_allView.cfm?whichone=Nomenclature&thisName=Phytophthora%20phaseoli&fromallCount=true&organismtype=Fungus
- Flier, W. G., Grünwald, N. J., Kroon, L. P. N.M., Van den Bosch, T. B. M., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldaña, H., Bonants, P. J. M., y Turkensteen, L. J. (2002). *Phytophthora ipomoeae* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Ipomoea longipedunculata* in the Toluca Valley of central Mexico. *Mycological Research*, 106(7), 848-856. doi: 10.1017/S0953756202006123
- Forbes, G.A., Morales, J.G., Restrepo, S., Perez, S., Gamboa, S., Ruiz, R., Ceden, L., Fermin, G., Andreu, A., Acuna, I., y Oliva, R. (2013). *Phytophthora infestans* and *Phytophthora andina* on Solanaceous hosts in South America. In: Lamour K (ed). *Phytophthora: a global perspective*. CABI International, Oxfordshire, pp 48–58
- Galindo, J. y Hohl, H. R. (1985). *Phytophthora mirabilis*, a new species of *Phytophthora*. *Sydowia* 38: 87-96.
- Gómez-Alpizar, L., Hu, C., Oliva, R., Forbes, G. y Ristaino, J. B. (2017). Phylogenetic relationships of *Phytophthora andina*, a new species from the highlands of Ecuador that is closely related to the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Mycologia*, 100(4), 590-602, doi: 10.3852/07-074R1
- Grünwald, N. J., y Flier, W. G. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 171-190. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H., Handsaker, R.E., Cano, L.M., ... y Nusbaum, C. (2009). Genome sequence and comparative analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461, 393–398. doi: 10.1038/nature08358
- Kroon, L. P. N.M., Brouwer, H., de Cock, A. W. A. M., y Govers, F. (2012). The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* 102,(4), 348-364. doi: 10.1094/PHYTO-01-11-0025
- Lassiter, E. S., Russ, C., Nusbaum, C., Zeng, Q., Saville, A., Olarte, R., Carbone, I., Hu, C., Seguin-Orlando, A., Samaniego, J. A., Thorne, J., y Ristaino, J. B. (2015). Mitochondrial genome sequences reveal evolutionary relationships of the *Phytophthora* lc clade species. *Current Genetics*, 61(4), 567-577. doi:10.1007/s00294-015-0480-3

- Martin, F. N., Abad, Z. G., Balci, Y., e Ivors, K. (2012). Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*, 96(8), 1080-1103. doi: 10.1094/PDIS-12-11-1036-FE
- Wang, J., Fernández-Pavía, S. P., Larsen, M. M., Garay-Serrano, E., Gregorio-Cipriano, R., Rodríguez-Alvarado, G., Grünwald, N. J. y Goss, E. M. (2017). High levels of diversity and population structure in the potato late blight pathogen at the Mexico centre of origin. *Molecular Ecology*, 26, 1091–1107. doi:10.1111/mec.14000

CAPÍTULO I. SINÓPSIS DEL CLADO 1C DEL GÉNERO
Phytophthora

CHAPTER I. SYNOPSIS OF THE *Phytophthora* CLADE 1C
SPECIES

RESUMEN

El género *Phytophthora* incluye aproximadamente 120 especies. *P. infestans*, *P. mirabilis*, *P. ipomoea*, *P. phaseoli* y *P. andina* se encuentran en el clado 1c de los 10 clados en los que actualmente se distribuyen las especies del género. Estas especies están relacionadas genéticamente (distancias genéticas cercanas), la especie más estudiada es *P. infestans*, por ser el agente causal del tizón tardío de la papa. La presencia de *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* en el altiplano central mexicano obedece a una evolución simpátrica, la especiación pudo haberse originado por el salto de hospedero, seguido de una especialización a través de mutaciones de los genes efectores del patógeno. Considerando los impactos continuos y negativos de *P. infestans*, entender su biología es imperativo para establecer nuevas estrategias de manejo. En esta revisión se puntualiza los aspectos biológicos, las estrategias evolutivas (aspectos evolutivos) y el método para caracterizar las poblaciones (aspectos poblacionales) del clado 1c.

Palabras clave:

Centro de origen, coevolución del parasitismo, tamaño del genoma, marcadores moleculares.

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Mercedes María Cuenca Condoy
Director: Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ABSTRACT

The genus *Phytophthora* includes 120 species. *P. infestans*, *P. mirabilis*, *P. ipomoea*, *P. phaseoli* and *P. andina*, are into clade 1c of the 10 clades that are currently distinguished within the genus. Genetically, the pathogens are closely related, the most studied species is *P. infestans*, because it is the causal agent of potato late blight. Sympatric evolution of *P. infestans*, *P. mirabilis* and *P. ipomoeae*, in the highlands of central Mexico has occurred, host jumps followed by host specialization through mutations of effector genes may be driving speciation in the clade. To effectively manage the disease, it is very important to know the biology of the clade 1c. In this review are pointed the biological aspects, the evolutionary strategies (evolutionary aspects) and the characterization of populations (populations aspects) in the clade 1c.

Keywords:

Center of origin, host-parasite coevolution, genome size, molecular markers.

Ph. D. Thesis in Horticultural Sciences, Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Mercedes María Cuenca Condoy

Advisor: Dr. Héctor Lozoya Saldaña

INTRODUCCIÓN

El género *Phytophthora* incluye aproximadamente 120 especies cuyos hospederos son más de 1000 especies de plantas, causando pérdidas económicas cada año en cultivos y plantas ornamentales (Martin et al., 2012). Tradicionalmente las especies del género *Phytophthora* se organizaron en seis grupos debido a las características morfológicas y fisiológicas, se utilizaba la clave de identificación de Waterhouse (1963); sin embargo, con análisis filogenéticos de secuencias nucleares y mitocondriales se han redistribuido en 10 clados (Martin et al., 2012; www.phytophthoradb.org).

En la filogenia de *Phytophthora*, en el clado 1c se encuentran: *P. infestans*, *P. mirabilis*, *P. ipomoea*, *P. phaseoli* y *P. andina*. Estas especies están relacionadas entre ellas, teniendo un ancestro común, y su distancia genética es muy cercana (Kroon et al., 2012). La especie más estudiada, del clado 1c, es *P. infestans*, por ser el agente causal del tizón tardío, la enfermedad más devastadora del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*)(Wang et al., 2017).

Esta revisión tiene como objetivo resumir los aspectos biológicos, las estrategias evolutivas (aspectos evolutivos) y el método para caracterizar las poblaciones (aspectos poblacionales) del clado 1c, con especial detalle en *P. infestans*; estas particularidades biológicas se deben considerar al desarrollar estrategias de control efectivas del patógeno.

1.4. ASPECTOS BIOLÓGICOS

1.4.1. Centro de origen de las especies del clado 1c del género *Phytophthora*.

Existe controversia sobre el centro de origen de las especies que pertenecen al clado 1c, del género *Phytophthora*. Por un lado, se ha propuesto al Valle de Toluca, como el centro de origen de todas las especies del clado 1c (Lassiter et

al., 2015, Flier et al., 2002); la otra corriente es que *P. infestans* se originó en los Andes en Sudamérica (Lassier et al., 2015).

Entre las razones para considerar a México como centro de origen de *P. infestans* se encuentran: **la diversidad genética** de las poblaciones originadas por la reproducción sexual, evidente en poblaciones aisladas del Valle de Toluca; **la presencia de genes de resistencia** a *P. infestans* de especies endémicas de papas (*Solanum demissum*); **especies cercanas** relacionadas como *P. ipomoeae* y *P. mirabilis* endémicas de México y **la presencia de tipos de compatibilidad** de *P. infestans* que están relacionados en la reproducción sexual (Martin et al. 2015).

Los argumentos para considerar a los Andes como centro de origen de *P. infestans*, se basan en **la presencia de hospederos alternos** endémicos de la familia de las solanáceas; y en evidencias moleculares, como el análisis de secuencias genómicas mitocondriales de *P. infestans* que muestra la presencia de uno de los dos grupos de **haplotipo mitocondrial (tipo II)** mayoritariamente dentro de los aislamientos de Sudamérica, análisis coalescentes que sustentan que las **mutaciones más antiguas** de los *loci* nucleares y mitocondriales ocurrieron exclusivamente en los aislamientos sudamericanos; y **la diversidad alélica** elevada de las líneas clonales US-1 en Ecuador sugiere que esta línea es endémica del país (Martin et al. 2015).

1.4.2. *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary: Tizón tardío de la papa

La enfermedad

El tizón tardío es la enfermedad más devastadora de papa (*Solanum tuberosum*) y tiene distribución mundial. Se estima que ésta enfermedad, genera pérdidas anuales en la producción del cultivo de 4800 millones de euros (€) (Wang et al., 2017). Ninguna otra enfermedad de plantas ha causado tan amplia dispersión humana e impacto social (Erwin y Ribeiro, 1996).

Históricamente el daño más grave ocurrió, sin duda, en el año de 1845 en Irlanda. La enfermedad destruyó en su totalidad los campos de papa, ocasionando hambruna, muerte a miles de personas y la migración de muchos sobrevivientes a otros lugares de Europa y América del Norte (Agrios, 2005). El patógeno, *P. infestans* (Mont.) De Bary, ingresó a Europa en 1840, en materiales de papa importados de América del Norte y América del Sur; como respuesta a la degeneración del material de propagación existente en Europa en aquella época (Wang et al., 2017).

Agente causal

P. infestans, es un oomicete, agente causal del tizón tardío de la papa. Morfológicamente *P. infestans* tiene micelio cenocítico, sin septas que separen el micelio, los esporangios (unidad de reproducción asexual) de forma alimonada, ahusados en la base, caducos semipapilados y con un pedicelo menor de 3 mm. Su tamaño varía de $36 \times 22 \mu\text{m}$ a $29 \times 19 \mu\text{m}$. Los esporangióforos son de crecimiento continuo, con un pequeño hinchamiento justo debajo del esporangio (Pérez y Forbes, 2008).

Las oosporas producto de la reproducción sexual, tienen un diámetro promedio de $30 \mu\text{m}$ ($24\text{--}35 \mu\text{m}$) las que se forman en las hojas, mientras que las formadas en medio de cultivo, entre 24 a $56 \mu\text{m}$ de diámetro. La reproducción sexual favorece la supervivencia del patógeno y genera nuevas combinaciones de genes (Pérez y Forbes, 2008).

Nomenclatura y Clasificación taxonómica

P. infestans (Mont.) De Bary, se deriva de las palabras griegas *Phyto* planta, *phthora* destructor. Matius de Prusia en 1842 lo llamó *Gangraena tuberum solani*, primera descripción del hongo que causó la enfermedad en casi toda Europa. En 1845, Morren de Bélgica escribió varias cartas en las que sostuvo que un hongo era la causa del tizón tardío, Montagne aceptó la teoría de Morren y describió *Botrytis infestans* (1845), fue confirmado por Antony de Bary

en 1876 como *Phytophthora infestans* (Erwin y Ribeiro, 1996). *P. infestans* pertenece al reino Chromista, clase Oomycetes (Figura 1). Los oomicetes son distintos a los patógenos del reino Fungi, aunque comparten características morfológicas, también poseen características que los hacen únicos.

Los oomicetos, están más cercanamente relacionados con las algas, dado que presentan meiosis en los gametangios, por lo tanto sus núcleos vegetativos son de naturaleza diploide, mientras las células vegetativas de las especies del reino Fungi son haploides (Raffaele y Kamoun, 2012). Las septas (paredes celulares) en las hifas son raras, resultando en una condición multinucleada (llamada cenocítica) (Fry y Grünwald, 2010). La pared celular contiene principalmente celulosa y β -1,3 y β -1,6 glucanos y no quitina (el polímero de N-acetil glucosamina, que se encuentra en las paredes de los hongos verdaderos) (Pérez y Forbes, 2008; Raffaele y Kamoun, 2012), además la pared celular no tiene capacidad de sintetizar los esteroides (Erwin y Ribeiro, 1996). Muchas especies de oomicetos, producen esporas acuáticas (zoosporas) carentes de pared celular, biflageladas contenidas en estructuras llamadas esporangios (Fry y Grünwald, 2010).

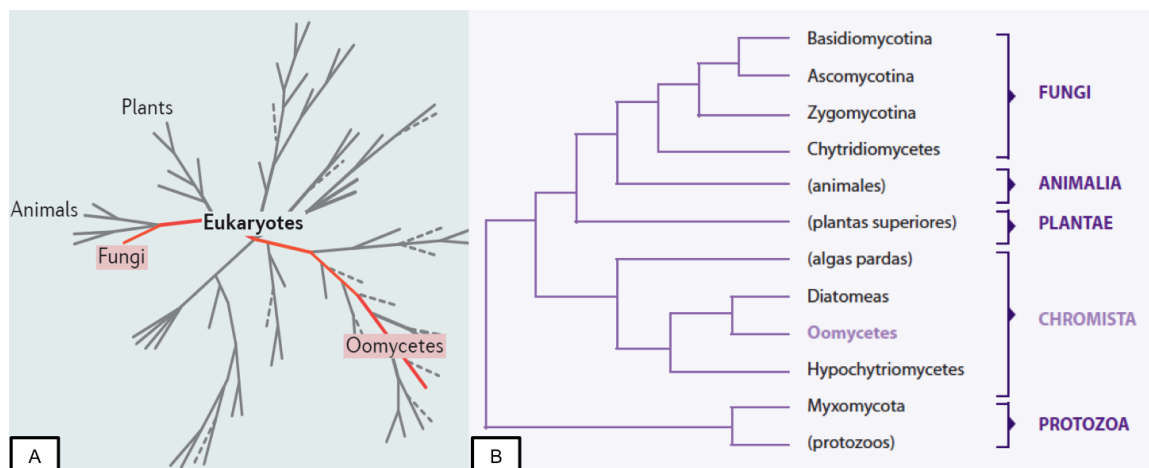


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre los cinco reinos de eucariotas. A) relación entre los dos grupos de fitopatógenos filamentosos y B) diagrama esquemático de las relaciones entre los cinco reinos de eucariotas (tomado de Raffael y Kamoun, 2012; Pérez y Forbes, 2008)

Sintomatología

Los síntomas inicialmente se desarrollan en los bordes de las hojas inferiores de la planta, se presentan manchas de apariencia húmeda, de color verde oscuro, de forma irregular, no delimitadas por las nervaduras de las hojas (Figura 2A) (Pérez y Forbes , 2008).



Figura 2. Síntoma de tizón tardío en papa en el Valle de Toluca. A) necrosis en el envés de hoja. B) lesión en tallo

En condiciones de alta humedad, en el envés de las hojas se desarrolla el micelio de color blanco. La enfermedad es policíclica, es decir puede presentar varios ciclos durante una temporada, comienzan rápidamente a desarrollarse nuevas lesiones en el resto de las plantas, en menos de una semana puede afectar y colapsar completamente un cultivo (Pérez y Forbes, 2008). Las lesiones se expanden rápidamente y se tornan de color café oscuro,

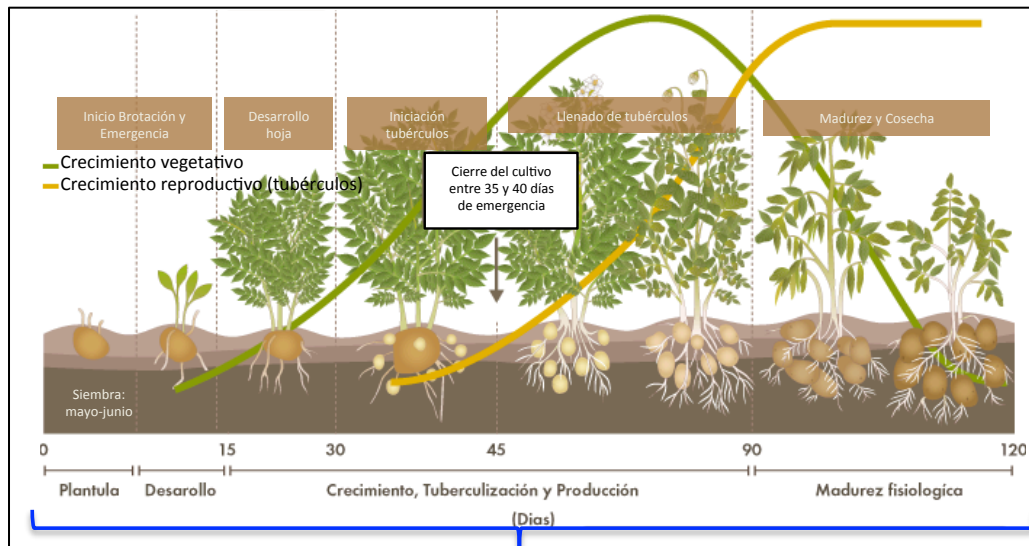
posteriormente se necrosa el tejido, pudiendo avanzar la infección hasta los tallos (Figura 2B).

En los tallos, los síntomas se observan en la parte superior de la planta, a partir del tercio medio, son lesiones necróticas de color café oscuro a negro y pueden variar desde unos pocos centímetros hasta 10 cm de longitud (Figura 2B). Cuando la lesión ha atacado el diámetro completo del tallo, este se vuelve quebradizo, sobre todo al paso de personas o maquinarias de trabajo; también se puede observar esporulación del patógeno bajo condiciones de alta humedad (Pérez y Forbes, 2008). En los tubérculos, los síntomas se presentan como lesiones necróticas, secas y de color café, que penetran el tejido, extendiéndose desde unos pocos milímetros hasta 3 cm. El tejido bajo la lesión es firme, con una apariencia granulosa de color marrón (Agrios, 2005).

Epidemiología y ciclo

Las epifitias de Tizón tardío aparecen de acuerdo a las condiciones ambientales predominantes durante el desarrollo del cultivo de papa. El patógeno crece y esporula mejor en humedades relativas sobre el 80 % y temperaturas de entre 15 y 25 °C (Agrios 2005); condiciones, que en el Valle de Toluca coinciden con la época de desarrollo vegetativo del cultivo de papa. Las zoosporas necesitan agua libre para su germinación y penetración. Una vez que la infección se produce, la enfermedad se desarrolla más rápidamente a temperaturas de 21°C (Figura 3) (Pérez y Forbes, 2008).

El patógeno hiberna como micelio en tubérculos infectados (Figura 3), ya sea en la bodega o en el campo. Desde el tubérculo, el micelio crece alcanzando los brotes y produciendo colapso celular. Cuando el micelio alcanza la parte aérea de la planta, produce zoosporangios. Éstos son dispersados por el agua de lluvia y el viento, depositándose en hojas y tallos húmedos, donde inician una nueva infección. Bajo condiciones frías nocturnas, los zoosporangios pueden formar zoosporas en su interior, las cuales también son infectivas (Agrios, 2005).



Patogénesis de *Phytophthora infestans* en el Valle de Toluca

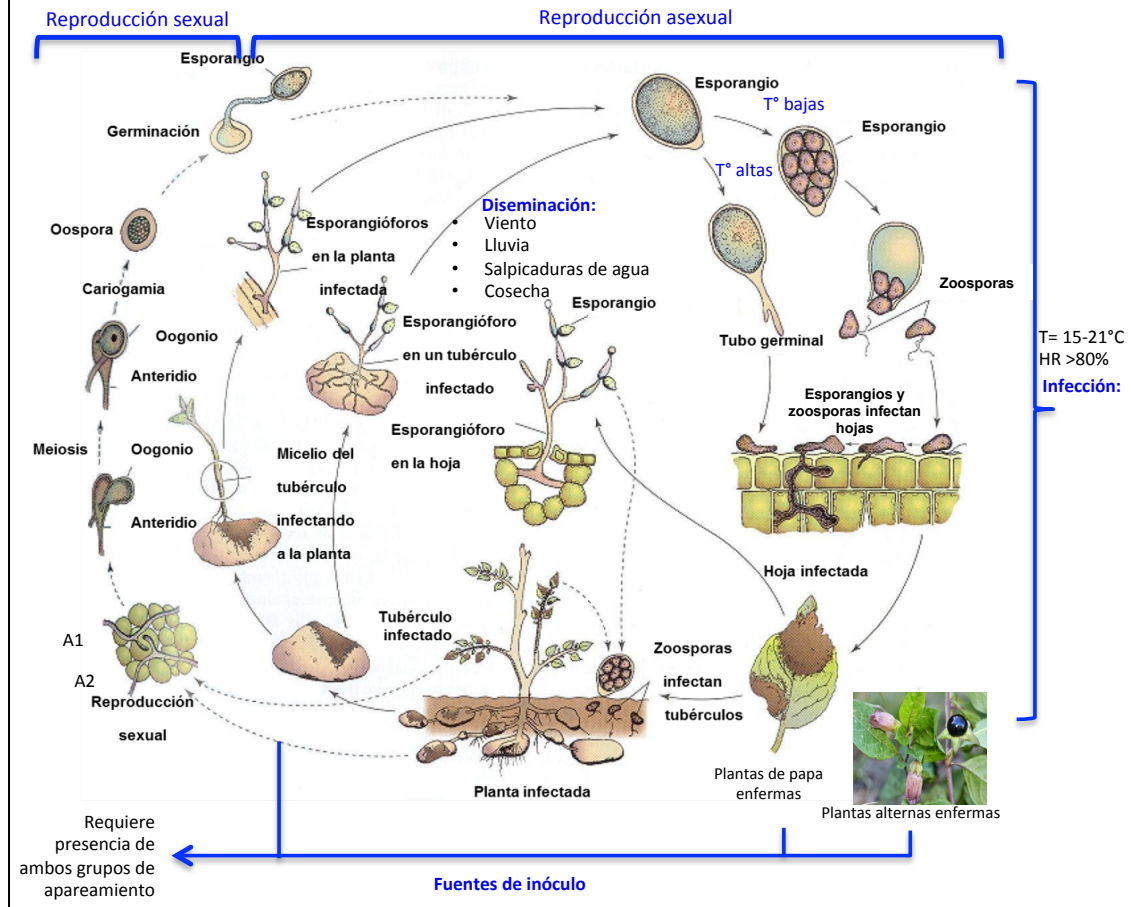


Figura 3. Esquema de la patogénesis de *P. infestans* en el Valle de Toluca (adaptado de Agrios, 2005)

Si las condiciones de humedad prevalecen, nuevos zoosporangios y zoosporas son formados, por tanto, gran cantidad de nuevas infecciones pueden ser producidas en una estación de crecimiento (Erwin y Ribeiro, 1996). La infección de los tubérculos comienza cuando las zoosporas son lavadas por la lluvia desde las hojas y caen al suelo, donde infectan los tubérculos por las lenticelas o heridas. Los tubérculos también pueden infectarse al momento de la cosecha al tomar contacto con follaje enfermo o con tubérculos enfermos durante la manipulación y selección de semilla (Agrios, 2005).

Fase asexual

En presencia del agua libre y temperaturas bajas, los esporangios germinan indirectamente (8-12 zoosporas uninucleadas y biflageladas), las zoosporas se enquistan sobre superficies sólidas, luego en presencia de alta humedad pueden desarrollar un tubo germinativo y penetran a la hoja por los estomas, o forman un apresorio; de manera que la hifa ingresa a través de la cutícula de la hoja, una vez dentro de la planta el micelio se desarrolla intercelularmente formando haustorios dentro de las células (Smart, Mayton, Mizubutim Willmann y Fry, 2000). Cuando la temperatura es mayor a 15 °C, los esporangios pueden germinar directamente (Figura 3) (Pérez y Forbes, 2008).

Fase sexual

La formación de oosporas es relevante en el ciclo de vida de *P. infestans*, son necesarios los dos tipos de apareamiento (A1 y A2) para la reproducción sexual. Las esporas se forman a medida que cada tipo de apareamiento responde a la hormona inducida por el tipo de apareamiento contrario, produciendo un oogonio y un anteridio (Fry y Grünwald, 2010).

La meiosis ocurre inmediatamente antes del desarrollo de los gametangios, representando el único estado haploide del ciclo de vida del organismo; la cariogamia se da entre los dos núcleos haploides, formando una oospora diploide uninucleada de paredes gruesas, con la capacidad de constituirse

como una estructura de supervivencia para el invierno en las zonas templadas, capaz de sobrevivir en ausencia del hospedero (Peters, Platt, Hall y Medina, 2014; Smart et al., 2000). Las oosporas forman un tubo germinativo sobre el cual se forma un zoosporangio similar a los de la reproducción asexual, el cual germina y las zoosporas resultantes son capaces de iniciar un nuevo ciclo de vida (Agrios, 2005).

1.5. ASPECTOS EVOLUTIVOS

1.5.1. Genoma de *P. infestans* (Mont.) de Bary

El genoma de *P. infestans* tiene 240 megabases (Mb), 74 % son secuencias repetitivas de ADN, la mayoría de las repeticiones son similares a las secuencias consenso, indicando un alto grado de actividad de transposones (Figura 4) (Raffaele y Kamoun, 2012). El genoma posee 17797 genes codificadores de proteínas, existen proteínas efectoras, implicadas en el proceso de patogenicidad que afectan la fisiología del hospedero y le facilitan la colonización (Hass et al., 2009).

Las proteínas efectoras pueden ser apoplásticas y citoplásmicas. Los efectores apoplásticos se acumulan en el espacio intercelular (apoplasto), como enzimas hidrolíticas (proteasas, lipasas y glicosilasas), inhibidores enzimáticos que protegen al patógeno de las enzimas de defensa del hospedero y toxinas de necrosamiento como *Nep1-like Proteins* (NLPs) y *PCF-like pequeños cysteine-rich* (SCRs). Los efectores citoplásmicos, que son translocados directamente al interior de la célula de la planta por estructuras especiales de infección, llamadas haustorios (Hass et al., 2009).

Número cromosómico y ploidías

El tamaño del genoma monoploide de *P. infestans* es de 2 a 4 veces más grande que otras especies de *Phytophthora* (Raffaele y Kamoun, 2012). Se ha determinado que los aislamientos mexicanos son diplofásicos y generativamente diploide (2n) con un número básico de cromosomas de $x=9$ y

un numero de cromosoma haplofásico $n=9$, $9+1$ y $9-1$; por tanto el numero de cromosomas diplofásicos varía entre 16 y 20 (Brasier y Sansome 1975 citado por Catal et al., 2010).

Tooley y Therrien (1987) reportaron que la población sexual de los aislamientos mexicanos son diploides, tienen menor cantidad de ADN comparado con los aislamientos de otros países, por ejemplo las cepas británicas tienen aproximadamente dos veces el número de cromosomas comparado con los aislamientos de Toluca, México; esta condición tetraploide podría estar relacionada con la adaptación del patógeno a condiciones más frías (Sansome 1977).

En 2010 usando citometría de flujo por laser, se confirmó que la heterocariosis y la poliploidía son condiciones de *P. infestans*, las evidencias mostraron que contenido de ADN por núcleo varía considerablemente entre los aislamientos esto es favorecido porque el patógeno tiene células cenocíticas multinucleadas y presumiblemente gana flexibilidad genética con las condiciones del núcleo heterocariótico, particularmente cuando la población nuclear en una célula difiere en el contenido de ADN (Catal et al., 2010).

1.5.2. ¿Por qué es tan grande el genoma de las especies del clado 1c?

Los genomas de los oomicetes fitopatógenos son mas grandes, comparados con su pariente más cercano no patogénico, *Phaeodactylum tricornutum*, diatomea con un genoma del tamaño de 27 Mb (Bowler et al., 2008); debido a la proliferación de ADN repetitivo, especialmente elementos transponibles (secuencias de ADN que poseen la capacidad intrínseca de cambiar de posición dentro del genoma). En *P. infestans*, el 74 % del genoma son elementos transponibles (Figura 4) (Raffaele y Kamoun, 2012).

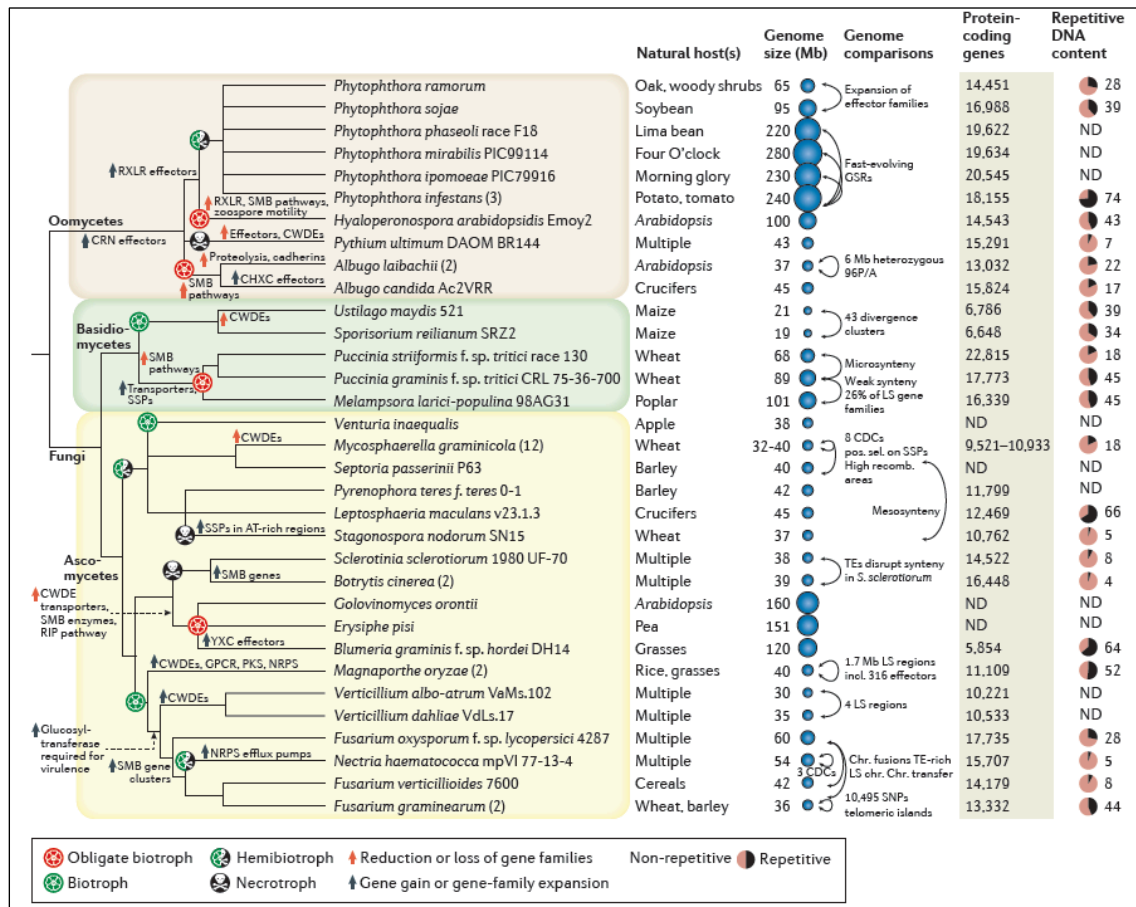


Figura 4. Características principales de los genomas secuenciados de los fitopatógenos filamentosos. Junto al dendrograma se muestran: hospederos principales, tamaño del genoma, comparaciones entre los genomas, número de genes codificadores de proteínas y contenido de ADN repetitivo (Tomado de Raffaele y Kamoun, 2012).

La domesticación de los hospederos favorece la formación de linajes específicos de patógenos, pudiendo evolucionar y expandirse el genoma de los fitopatógenos que interactúan con el hospedero (Raffaele y Kamoun, 2012). Sin embargo, un caso diferente es el que presentan los genomas de las *Phytophthoras* del clado 1 c, cuyas dimensiones se encuentran entre 220-280 Mb (Figura 5); genomas grandes aun cuando los hospederos de *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* son plantas silvestres, *Mirabilis jalapa* e *Ipomoeae orizabensis* (Badillo-Ponce et al., 2004), respectivamente. La expansión del genoma, en este clado 1c, debió darse antes de la domesticación (Raffaele y Kamoun, 2012).

En conclusión, el tamaño mayor del genoma de los oomicetos fitopatógenos, le confiere plasticidad debido a los elementos transponibles cuyos efectos pueden ser: delección y pseudogenización, silenciameinto genético, remplazo de aminoácidos, presencia de proteínas quimeras, y nuevos genes con nuevas funciones (Raffaele y Kamoun, 2012).

1.5.3. Coevolución del parasitismo de *P. infestans* con el género *Solanum*

Existe una continua evolución de la habilidad de las plantas hospederos para reconocer las razas de patógenos que anteriormente no eran reconocidas, mientras que el patógeno evoluciona para evitar el reconocimiento por un hospedero previamente resistente (Benezer-Benezer et al., 2008).

Mecanismos de las plantas

El sistema inmune de la planta está compuesto por una red compleja de mecanismos activos y pasivos que dificultan la colonización del patógeno en el hospedero (Figura 5) (Martínez-Pacheco, 2017). Entre los mecanismos se encuentran: la síntesis de enzimas hidrolíticas que actúan sobre el patógeno, la síntesis de fitoalexinas, cambios en las proteínas estructurales de la pared celular, activación de la transcripción de genes específicos “genes R” en respuesta a los elicitores del patógeno, el incremento de la concentración de las especies reactivas del oxígeno (ERO), entre otros (Afzal, Khurshid, Ashraf y Kasi, 2014).

La primera línea de defensa es el reconocimiento de moléculas conservadas que se secretan o están en la superficie del patógeno, patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs (del inglés: *Pathogen-associated molecular patterns*), que incluyen elicitores y efectores; este reconocimiento ocurre a través de receptores transmembranas en las células vegetales, receptores de reconocimiento de patrones PRRs (del inglés: *Pattern Recognition Receptor*) y provocan el desarrollo de una respuesta inmune inducida por PAMs (PTI, del

inglés: *PAMP-triggered immunity*) que los patógenos deben vencer para la colonización. La PTI involucra la transmisión de señales en el interior de la célula a través de cascadas de fosforilación (Figura 5) (Lehmann et al., 2015).

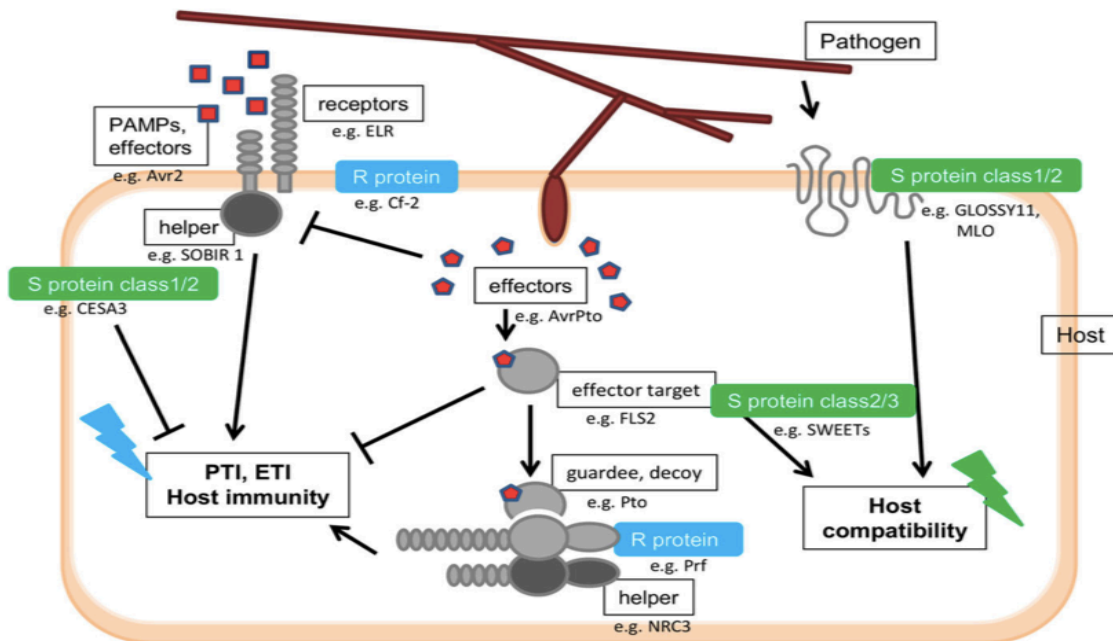


Figura 5. Inmunidad innata de la planta: PTI y ETI. Los PAMPs, los efectores intracelulares son percibidos por los receptores en la membrana plasmática o por las proteínas de resistencia R en el citoplasma, resultando la activación del PTI y ETI (Tomado de Sun et al., 2016)

La segunda línea de defensa consiste en la presencia de los genes R y de sus productos, que codifican a proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), son proteínas ricas en Leucina (Afzal et al., 2014). La activación de estos genes, responde a moléculas llamadas efectores, que al ser reconocidas reciben el nombre de factores de avirulencia o proteínas de avirulencia (Sun et al., 2016). Debido a que la relación es gen por gen, es decir, un gen de resistencia en la planta y un gen avirulento en el patógeno; el evento se denomina inmunidad inducida por efectores (ETI). La PTI y ETI son las dos ramas principales de la inmunidad de las plantas (Sun et al., 2016).

Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, del inglés: Systemic Acquired Resistance)

La resistencia se da en la planta varios días después de sobrevivir a la infección, como resultado del aumento en los niveles de compuestos de defensa como quinasas y otras enzimas hidrolíticas. El ácido salicílico se utiliza como señal endógena de la planta (Taiz y Zeiger, 2003).

Para que una planta sea resistente a la infección de un patógeno se requiere: que la planta sea capaz de identificar al patógeno, la activación de las rutas del complejo metabólico en las células infectadas y la propagación de la resistencia dentro de los tejidos de la planta. La respuesta basal es la hipersensibilidad, que conduce a la muerte celular programada (Afzal et al., 2014).

Mecanismos del patógeno

Genotipos más agresivos

La virulencia se refiere a la habilidad genética de una raza de *P. infestans* para vencer la resistencia del hospedero causando una reacción de compatibilidad, es decir se produce la enfermedad. Los genes de resistencia (genes R de la planta) codifican productos que identifican en forma específica a los productos codificados por genes de avirulencia del patógeno. La pérdida o cambio del gen de avirulencia permite la compatibilidad (Pérez y Forbes, 2008).

Presencia de proteínas efectores del patógeno

Los oomicetes pueden suprimir la respuesta inmune activada por sus propios elicitores secretando proteínas efectoras que puedan actuar en diferentes compartimentos celulares; alterando al estado fisiológico de la planta para beneficiar la colonización.

El efector AVR3A suprime la percepción del elicitador PAMP INF1; el efector se origina en el citosol del patógeno y es secretado a través de la pared celular del patógeno al apoplasto donde puede estar en contacto con las células de la

planta o con la matriz extrahaustorio; donde modifica ese ambiente en que el patógeno se está desarrollando, secretando moléculas para estabilizar las proteínas efectoras que inhiben la síntesis de enzimas hidrolíticas por parte de la planta, algunas moléculas de la membrana de la planta actúan como translocadores de los efectores al interior de las células de las plantas. De tal manera que la respuesta de defensa de la planta queda inhabilitada por la presencia de los efectores (Fawke, Doumane y Schornack, 2015).

1.5.4. La hibridación interespecífica

La hibridación interespecífica es común en el género *Phytophthora*, acontecimiento que contribuye a la evolución, permite el cambio de hospedero de las especies (*host jump*), la disminución de la reproducción sexual, y la subsecuente especialización (Martin et al., 2015). La fuerza evolutiva incrementa el *fitness* (incremento de agresividad, resistencia a fungicidas y alelos de virulencia) y el cambio de nicho de los patógenos (colonización de otros hospederos).

En el género *Phytophthora* se han identificado híbridos naturales y se han obtenido híbridos artificiales en el laboratorio: *P. infestans* x *P. mirabilis*, *P. nicotianae* x *P. capsici*, *P. sojae* x *P. vignae* y *P. capsici* x *P. tropicalis* (Kroon et al., 2012).

La capacidad del género *Phytophthora* para producir híbridos puede ser la causa de la generación de nuevos patógenos con tanta rapidez, para ejemplificar, se cita el caso ocurrido en los Países Bajos donde un híbrido entre *P. hedraiaandra* y *P. cactorum* mostró mayor virulencia en *Rhododendron* que sus progenitores (Man in 't Veld, de Cock y Summerbell, 2007).

La hibridación es favorecida por tres puntos: el incremento en el comercio de plantas (introducción de los patógenos asociados a nuevas regiones con condiciones climáticas diferentes), el manejo de los cultivos en sistemas hidropónicos y la intervención humana (la contaminación, el cambio climático y

el cambio en el uso del suelo). Lo anterior favorece la adaptación de los nuevos híbridos con atributos patogénicos (Érsek y Nagy, 2008).

La epidemiología de los híbridos es semejante a la de un nuevo patógeno en un ambiente determinado sin embargo, la diferencia es que el patógeno representa un solo genoma de una sola población, mientras que el híbrido incrementa la plasticidad genética (Kroon et al., 2012).

1.5.5. Resistencia al metalaxil

El metalaxil fue el primer fungicida de la familia de las fenilamidas, fue introducido en los años 70 como un fungicida sistémico para combatir oomicetes y ha sido ampliamente utilizado contra *Phytophthora*, *Pythium* y algunos otros mildius (Matson, Small, Fry y Judelson, 2015).

A nivel mundial, uno de los primeros registros sobre la resistencia a metalaxil se reportó en Países Bajos en 1980 (Davidse et al., 1981). Numerosos estudios posteriores de caracterización de poblaciones del oomiceto han registrado el incremento de la frecuencia de aislamientos resistentes en diferentes países (Dagget, Götz y Therrien, 1993; Matuszak et al., 1994, Grünwald y Flier, 2005). Los aislamientos resistentes han mostrado ser igualmente o mas agresivos que los individuos sensibles, convirtiéndose así la resistencia al metalaxil, en una característica agronómica importante en el manejo integrado de esta enfermedad y se usa como un marcador fenotípico para caracterizar poblaciones de *P. infestans* (Pérez y Forbes. 1998, Śliwka et al. 2006).

Actualmente, el ingrediente activo que se comercializa en México, es el R-enantiómero del metalaxil, Mefenoxam, tiene una mejor efectividad biológica contra oomicetes (Randall et al., 2014). Su actividad antifúngica se basa en la inhibición de la síntesis del ARN ribosomal, debido a que su objetivo es directamente sobre la ARN polI, encargada de transcribir a ARNr (Randall et al., 2014).

1.6. ASPECTOS POBLACIONALES (CARACTERIZACIÓN)

La genética poblacional describe y cuantifica la variación genética en determinadas poblaciones del patógeno (Klug et al., 2013). Esta variación se utiliza para inferencias acerca de los procesos de evolución del patógeno (Pérez y Forbes, 2008).

La caracterización que se realiza en poblaciones del género *Phytophthora* puede ser fenotípica (tipo de apareamiento, virulencia/agresividad de razas y sensibilidad al metalaxil), bioquímica (isoenzimas Gpi y Pep) y/o molecular (RFLPs nuclear y mitocondrial, PCR, secuenciación y microsatélites) (Martin et al., 2012).

1.6.1. Caracterización fenotípica

Virulencia y agresividad: la virulencia se refiere a la habilidad genética de una raza para vencer la resistencia del hospedero, causando una reacción de compatibilidad, es decir se produce la enfermedad; mientras que la agresividad se refiere al grado de daño que causa el patógeno (Pérez y Forbes, 2008).

Tipo de apareamiento: es un tipo de compatibilidad necesario para iniciar la reproducción sexual en especies heterotálicas, es un factor importante en la variación de poblaciones, aunque no presenta una segregación mendeliana (Pérez y Forbes, 2008).

La determinación del tipo de apareamiento de un aislamiento se puede realizar mediante cruzamiento *in vitro* del aislamiento a identificar, junto con una cepa de referencia de apareamiento conocido (A1 o A2). Existen además métodos moleculares mediante la aplicación de la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction), se emplean *primers* capaces de amplificar segmentos específicos de 1.35 Kb, correspondiente al locus S1 presente en el tipo A1 y ausente en el tipo

A2; en el caso del A2 el fragmento amplificado corresponde a 347 pb, ausente en el tipo A1 (Judelson et al., 1996).

1.6.2. Marcadores Bioquímicos de proteínas: Glucosa fosfato isomerasa (GPI) y Peptidasa (PEP)

La isoenzima es una variante de una enzima que comparte la misma función catalítica en el metabolismo celular. Las aloenzimas, son enzimas cuyas variantes son codificadas en el mismo locus, son alélicas, por tanto se utilizan para investigar poblaciones. Los patrones de las bandas son menos complejos que los de proteínas totales y se pueden diferenciar e interpretar más rápidamente, son estables, codominantes y generalmente están bajo control simple (Pérez y Forbes, 2008). En *P. infestans*, existe buena resolución para las isoenzimas glucosa-6-fosfato isomerasa (Gpi) y peptidasa (Pep), las cuales tienen control genético simple, con alelos mendelianos (Erwin y Ribeiro, 1996).

1.6.3. Marcadores moleculares

La replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) es un proceso biológico eficiente gracias a la capacidad de las ADN polimerasas y a los sistemas de corrección celulares para mantener la integridad de la molécula del ADN. Sin embargo, el ADN es susceptible a cambios que pueden modificar la secuencia de los nucleótidos de cualquier región del ADN y causar la variación genética entre especies y organismos. Estos cambios pueden ser, principalmente, sustituciones, deleciones e inserciones y producir variantes genéticas que provocan las modificaciones estructurales en proteínas (Moreno-Medina et al., 2009). Los marcadores moleculares posibilitan la detección de variantes en los genomas de los organismos de interés (Smart et al., 2000).

RFLPs: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción: utilizando la técnica se han determinado cuatro haplotipos del ADN mitocondrial de *P. infestans* (Ia Ib, IIa y IIb), se han diseñado cuatro pares de *primers* para la

amplificación de PCR, de regiones polimórficas conocidas del genoma mitocondrial de *P. infestans* (Griffith y Shaw, 1998).

Microsatélites: Los marcadores microsatélites fueron desarrollados para *P. infestans* usando una librería genómica para este patógeno, enriquecida con una secuencia simple de repetición (TC)_n (Knapova y Gisi, 2002).

1.6.4. Secuenciación

Para especies cercanas genéticamente, una herramienta para determinar la variabilidad es la secuenciación de genes constitutivos o también llamados *housekeeping* que se expresan de manera constitutiva en todos los tejidos, ubicados en mitocondrias e inclusive en el núcleo que codifican para proteínas encargadas del metabolismo básico de la célula (Kroon et al., 2012).

Región Espaciadora Interna Transcrita (ITS *Internal Transcribed Spacer*)

De las primeras regiones de ADN que se han usado para el análisis filogenético en el género *Phytophthora* son la 5.8S, ITS1 e ITS2, regiones genéticas que pertenecen al ADN ribosomal (ADNr), pudiéndose utilizar los mismos *primers* iniciadores para la amplificación de ADN en la mayoría de las especies del género, la desventaja es la baja e inclusive la falta de variabilidad en las secuencias genéticas del ITS en especies que están muy cercanas, tal es el caso de las especies pertenecientes al mismo clado (Cooke, Drenth, Duncan, Wagels y Brasier, 2000).

El ADNr es la secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo que codifican ARN ribosómico (ARNr) o genes ribosomales. Los genes ribosomales (subunidad pequeña, subunidad larga y la 5.8s) están organizadas en un *cluster* pero separadas por dos espacios internos transcritos (ITS1 e ITS2), estos son más susceptibles de acumular mutaciones. En un genoma de un organismo eucariota, los genes ribosomales se repiten en arreglos en tándem miles de veces, los espacios internos también son transcritos pero no traducidos, por tanto son más variables que los genes ribosómicos, los *primers*

ITS 4 e ITS 6 son los más usados para la secuenciación de *Phytophthora* (Grünwald et al 2011).

1.6.5. Análisis Filogenético

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas entre especies, agrupándolas por las similitudes de la información contenida en la secuencia de ADN y/o proteínas de los organismos a analizar, representándolo a través de árboles jerárquicos (Klug et al, 2013). Los árboles filogenéticos se pueden construir a partir de alineamientos múltiples de secuencias de ADN o aminoácidos, se asume que cada posición en el alineamiento es homóloga (Moreno-Medina et al., 2009).

Un análisis filogenético indica las relaciones evolutivas entre las secuencias o especies, la descendencia de ancestros comunes y las distancias entre ellas. Los métodos de reconstrucción filogenética más habituales asumen que todas las secuencias o especies provienen a partir de un ancestro común mediante bifurcaciones. El análisis filogenético tiene dos componentes: el árbol filogenético y la descripción de las probabilidades (Hall, 2013).

La acumulación de mutaciones en el ADN a lo largo del tiempo es la causa de que las secuencias de un mismo gen en dos especies distintas no sean idénticas. Cuanto más tiempo pase desde el último antecesor común habrá mayor diferencia entre las secuencias. En las secuencias, además de sustituciones de un residuo por otro pueden darse inserciones o deleciones. Una sustitución es un cambio de un residuo por otro. Cuando falta una base, hay un *gap*. Un *gap* puede corresponder tanto a una deleción como a una inserción (Moreno-Medina et al., 2009).

Un clado es una rama (del griego: klados) en el árbol filogenético, la cual está separada del resto del árbol por un simple corte, cada una de las ramas, sean largas o cortas, es monofilética o de un mismo origen, es decir que comparten un antepasado en común (Kroon et al., 2004). *P. infestans* y sus cuatro especies hermanas se encuentra en el clado 1c (Figura 6) (Kroon et al., 2012).

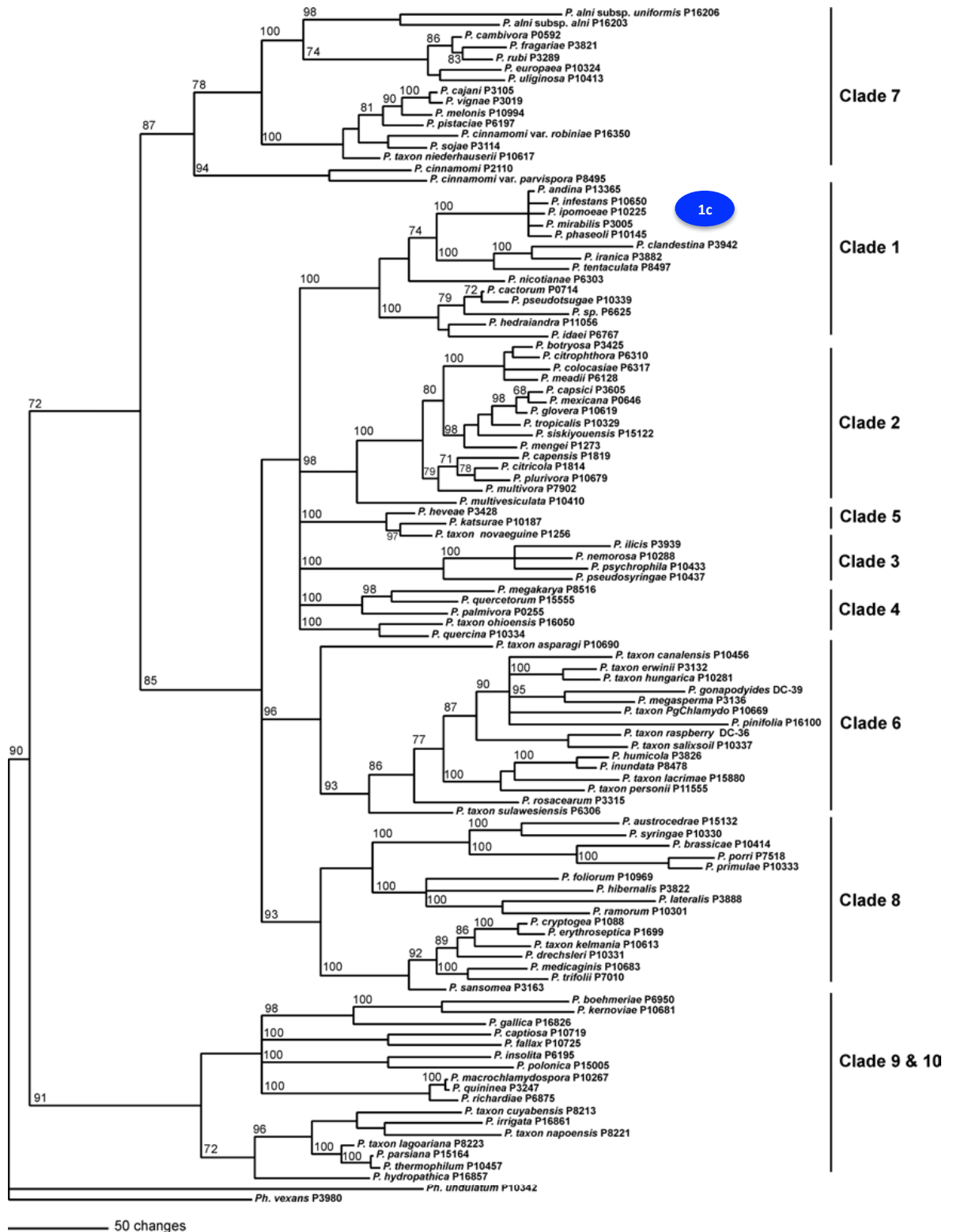


Figura 6. Árbol evolutivo de las especies del género *Phytophthora*, por el método de máxima parsimonia con la secuencia de genes: *cox2*, *nad9*, *rps10* y *secY* (Martin et al., 2012)

P. phaseoli se reportó por primera vez en Estados Unidos (Lassiter et al., 2015), su centro de origen es desconocido (Farr y Rossman, 2014), se ha reportado en México, América Central y América del Sur (Lassiter et al., 2015). *P. mirabilis*, ocasiona tizón en *Mirabilis jalapa* (Galindo y Hohl, 1985) y *P. ipomoeae* en *Ipomoea orizabensis* e *I. purpurea* (Badillo-Ponce et al., 2004; Flier et al., 2002). *P. andina* se ha reportado en Ecuador, Colombia y Perú (Forbes et al., 2013), esta especie es un híbrido entre *P. infestans* y una especie desconocida de *Phytophthora* (Lassiter et al., 2015).

1.6. LITERATURA CITADA

- Afzal, F., Khurshid, R., Ashraf, M., y Kasi, A. G. (2014). Chapter 13: Reactive oxygen species and antioxidants in response to pathogens and wounding. En A. Parvaiz (Ed.), *Oxidative damage to plants* (pp. 397-424). London, Reino Unido: Academic Press.
- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. USA: Elsevier Academic Press.
- Arora, R. K., Sanjeev, S., y Singh, B. P. (2014). Late blight disease of potato and its management. *Potato Journal*, 41(1), 14-40.
- Badillo-Ponce, G., Fernández-Pavia, S. P., Grunwald, N. J., Garay-Serrano, E., Rodríguez-Alvarado, G., Lozoya-Saldaña, H. (2004). First report of blight on *Ipomoeae purpurea* caused by *Phytophthora ipomoeae*. *Plant disease*, 88(11). 1283. doi: 10.1094/PDIS.2004.88.11.1283C
- Benezer-Benezer, M., Castro-Mercado, E., y García-Pineda, E. (2008). La producción de especies reactivas de oxígeno durante la expresión de la resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(1), 56-61.
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., y Grigoriev, I. V. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456, 239-244. doi:10.1038/nature07410
- Catal, M., King, L., Tumbalán, P., Wiriyaitsomboon, P., Kirk, W. W., Adams, G. C. (2010). Heterokaryotic nuclear conditions and a heterogeneous nuclear populations are observed by flow cytometry in *Phytophthora infestans*. *Cytometry A*, 77(8): 769-775. doi: 10.1002/cyto.a.20888
- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G. y Brasier, C. M. (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30, 17-32. doi: 10.1006/fgbi.2000.1202

- Daggett, S. S., Götz, E., y Therrien, C. D. (1993). Phenotypic changes in populations of *Phytophthora infestans* from Eastern Germany. *Phytopathology*, 83, 319-323. doi: 10.1094/Phyto-83-319
- Davidse, L. C., Looijen, D., Turkensteen, L. J., y Van der Wal, D. (1981). Occurrence of metalaxil-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87(2), 65-68. doi:10.1007/BF01976658
- Érsek, T. y Nagy, Z.Á. (2008). Species hybrids in the genus *Phytophthora* with emphasis on the alder pathogen *Phytophthora alni*: a review. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1), 31-39. doi:10.1007/s10658-008-9296-Z
- Erwin, D.C. y Ribeiro, O.K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. Minnesota, Estados Unidos: APS Press, American Phytopathological Society.
- FAOSTAT (2013, 2016) Statistics Division. Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Farr, D.F., Rossman, A.Y. (2014). *Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections*, ARS, USDA. Estados Unidos. Recuperado de https://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/new_allView.cfm?whichone=Nomenclature&thisName=Phytophthora%20phaseoli&fromallCount=true&organismtype=Fungus
- Fawke, S., Doumane, M., y Schornack, S. (2015). Oomycete interactions with plants: infections strategies and resistance principles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 263-280. doi:10.1128/MMBR.00010-15
- Flier, W. G., Grünwald, N. J., Kroon, L. P. N.M., Van den Bosch, T. B. M., Garay-Serrano, E., Lozoya-Saldaña, H., Bonants, P. J. M., y Turkensteen, L. J. (2002). *Phytophthora ipomoeae* sp. nov., a new homothallic species causing leaf blight on *Ipomoea longipedunculata* in the Toluca Valley of central Mexico. *Mycological Research*, 106(7), 848-856. doi: 10.1017/S0953756202006123
- Forbes, G.A., Morales, J.G., Restrepo, S., Perez, S., Gamboa, S., Ruiz, R., Ceden, L., Fermin, G., Andreu, A., Acuna, I., y Oliva, R. (2013). *Phytophthora infestans* and *Phytophthora andina* on Solanaceous hosts in South America. In: Lamour K (ed). *Phytophthora: a global perspective*. CABI International, Oxfordshire, pp 48–58
- Fry, W. E. y Grünwald, N. J. (2010). Introducción a los Oomicetes. Trans. Alberto J. Valencia-Botín. *The Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-I-2012-0220-01
- Galindo, J. y Hohl, H. R. (1985). *Phytophthora mirabilis*, a new species of *Phytophthora*. *Sydowia* 38: 87-96.

- Griffith, G. W., y Shaw, D. S. (1998). Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four Mitochondrial Haplotypes Are Detected after PCR Amplification of DNA from Pure Cultures or from Host Lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4007-4014
- Grünwald, N. J., Martin, F. N., Larsen, M. M., Sullivan, Press, C. M., Coffey, M. D., Hansen, E. M., y Parke, J. L. (2011). Phytophthora-ID.org: A sequence-based *Phytophthora* identification tool. *Plant Disease*, 95, 337-342. doi:10.1094/ PDIS-08-10-0609
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H., Handsaker, R.E., Cano, L.M., ... y Nusbaum, C. (2009). Genome sequence and comparative analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461, 393–398. doi: 10.1038/nature08358
- Hall, B.G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (5): 1229-1235. doi:10.1093/molbev/mst012
- Judelson, H. S. (1996). Genetic and physical variability at the mating type locis of the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics*, 144(3),1005-1013,
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., Palladino, M.A. (2013). Conceptos de Genética. Madrid, España: Pearson Educación.
- Knapova, G., y Gisi, U. (2002). Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* 51, 641-653. doi: 10.1046/j.1365-3059.2002.00750.x
- Kroon, L. P. N.M., Brouwer, H., de Cock, A. W. A. M., y Govers, F. (2012). The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* 102,(4), 348-364. doi: 10.1094/PHYTO-01-11-0025
- Kroon, L.P.N.M., Bakker, F.T., Van den Bosch, T.B.M. y Flier, W.G. (2004). Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 766-782. doi: 10.1016/j.fgb.2004.03.007
- Lassiter, E. S., Russ, C., Nusbaum, C., Zeng, Q., Saville, A., Olarte, R., Carbone, I., Hu, C., Seguin-Orlando, A., Samaniego, J. A., Thorne, J., y Ristaino, J. B. (2015). Mitochondrial genome sequences reveal evolutionary relationships of the *Phytophthora* Ic clade species. *Current Genetics*, 61(4), 567-577. doi:10.1007/s00294-015-0480-3
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S. E., y Metraux, J.P. (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry*, 112, 54-62. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.08.027
- Man in 't Veld, W. A., de Cock, A. W. A. M., y Summerbell, R. C. (2007). Natural hybrids of resident and introduced *Phytophthora* species proliferating on multiple new hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 25-33. doi: 10.1007/s10658-006-9065-9

- Martin M. D., Vieira, F. G., Ho, S. Y. W, Schubert, M., Seguin-Orlando, A, Ristaino, J. B., y Gilbert, M. T. (2015). Genomic characterization of a South American *Phytophthora* Hybrid mandates reassessment of the geographic origins of *Phytophthora infestans*. *Molecular Biology and Evolution*, 33(2), 478-491. doi:10.1093/molbev/msv241
- Martin, F. N. , Abad, Z. G., Balci, Y., e Ivors, K. (2012). Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease*, 96(8), 1080-1103. doi: 10.1094/PDIS-12-11-1036-FE
- Martínez-Pacheco, J. (2017). Proteínas R y percepción de efectores patogénicos en la familia Solanaceae. *Revista Protección Vegetal*. 32(1), 1-9.
- Matson, M. E. H., Small, I. M., Fry, W. E., y Judelson, H. S. (2015). Metalaxyl Resistance in *Phytophthora infestans*: Assessing Role of RPA190 Gene and Diversity Within Clonal Lineages. *Phytopathology*, 105(12), 1594-1600. doi: 10.1094/PHYTO-05-15-0129-R
- Matuszak, J. M., Fernandez-Elguezabal, J., Gu, W. K., Villarreal-Gonzalez, M., y Fry, W. E. (1994). Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. *Plant Disease*, 78(9), 911-916.
- Moreno-Medina, V.R., Sifuentes-Rincón, A. M., Pereyra-Alfárez, B. (2009). Herramientas para el análisis de la variación genético-molecular. *Ciencia UAN*, 12 (2): 201-205.
- Pérez, W., y Forbes, G. (2008). Manual técnico: El tizón tardío de la papa. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa. ISBN 978-92-9060-343-6
- Peters, R. D., Platt, H. W., Hall, R., y Medina, M. (1999). Variation in aggressiveness of Canadian isolates of *Phytophthora infestans* as indicated by their relative abilities to cause potato tuber rot. *Plant Disease*, 83, 652-661. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.7.652
- Phytophthora database, 2016. Disponible en: www.phytophthoradb.org
- Raffaele, S., y Kamoun, S. (2012). Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Reviews Microbiology*, 10(6), 417-430. doi: 10.1038/nrmicro2790
- Randall, E., Young, V., Sierotzki, H., Scalliet, G., Birch, P. R., Cooke, D. E. L., Csukai, M., y Whisson S. (2014). Sequence diversity in the large subunit of RNA polimerase I contributes to Mefenoxam insensitivity in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*, 15(7), 664-676. doi:10.1111/mpp.12124
- Sansome, E. (1977). Polyploidy and induced gametangial formation in British isolates of *Phytophthora infestans*. *Journal of General Microbiology*, 99. 311-316.

- Servicio de Información Agrolimentaria y Pesquera (SIAP). (2016). Cierre de la producción agrícola por cultivo y por Estado del año 2016. En línea: <http://www.siap.gob.mx/>
- Śliwka, J., Sobkowiak, S., Lebecka, R., Avendaño-Córcoles, J., y Zimnoch-Guzowska, E. (2006). Mating type, virulence, aggressiveness and metalaxil resistance of isolates of *Phytophthora infestans* in Poland. *Potato Research*, 49: 155-166. doi:10.1007/s11540-006-9013-2
- Smart, C. D., Mayton, H., Mizubuti, E. S. G., Willmann, M. R., y Fry W. E. (2000). Environmental and genetic factors influencing self-fertility in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 90(9), 987-994. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.9.987
- Sun, K., Wolters, A. A., Vossen, J. H., Rouwet, M. E., Loonen, A. E. H. M., Jacobsen, E., Visser, R. G. F., y Bai, Y. (2016). Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic Research*, 25, 731-742. doi: 10.1017/s11248-016-9964-2
- Taiz L. y Zeiger E. (2003). Capítulo 13: Metabolitos secundarios y defensa en las plantas. En Taiz L. y Zeiger E. (2003). Fisiología Vegetal. (pp. 529-580). Catelló de la Plana, España: Universitat Jaume.
- Tooley, P. M., y Therrien, C. D. (1987), Cytophometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans*. *Experimental Mycology* 11, 19-26.
- Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*, 94, 1-22.

**CAPÍTULO II. VARIABILIDAD DE LA RESISTENCIA AL
METALAXIL DE LAS ESPECIES MEXICANAS DEL CLADO 1C
DEL GÉNERO *Phytophthora***

**CHAPTER II. METALAXYL RESISTANCE OF THE MEXICAN
Phytophthora 1C CLADE SPECIES**

VARIABILIDAD DE LA RESISTENCIA AL METALAXIL DE LAS ESPECIES MEXICANAS DEL CLADO 1C DEL GÉNERO *Phytophthora*

Mercedes M. Cuenca-Condo¹, Héctor Lozoya-Saldaña^{1*}, Juan P. Legaria-Solano¹, Santos G. Leyva Mir², Mateo Vargas-Hernández², Ma. Teresa B. Colinas-León¹

¹Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, México 56230

²Protección Vegetal, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México, México 56230

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

Abstract

The study of *Phytophthora infestans* in areas near to the Toluca valley (it has been proposed as the center of origin of the pathogen) helps to understand the physical amplitude in which the variability occurs. A mutation in the large subunit of RNA polII contributed to the resistance of *P. infestans* to metalaxyl. The objective of the present study was to determine the phenotypic and genotypic variability in the resistance of *P. infestans* and *P. mirabilis* to metalaxil in the highlands of central Mexico. Metalaxyl resistance determined phenotypic diversity, while genotypic variability was assessed using polymorphisms in the RPA190 gene encoding the large subunit of RNA polII. The frequency of resistant isolates in the Toluca Valley was the lowest. A single nucleotide polymorphism SNP602GT was present in 62 % of the resistant isolates. These results conclude that the center of origin is larger than the Toluca valley area.

Resumen

El estudio de *Phytophthora infestans* en áreas cercanas al valle de Toluca, considerado centro de origen del patógeno, aporta al entendimiento de la amplitud del área física en la que se presenta variabilidad. La resistencia del patógeno al metalaxil se ha asociado con una mutación en la *ARN polII*. El objetivo del presente trabajo fue determinar la variabilidad fenotípica y genotípica de la resistencia a metalaxil de *P. infestans* y *P. mirabilis* en diferentes localidades del altiplano mexicano. La diversidad fenotípica se evaluó con la resistencia *in vitro* al metalaxil y la genotípica con los polimorfismos del gen que codifica para la subunidad RPA 190 de la *ARN polII*. En Toluca existió menor frecuencia de aislamientos resistentes. Un polimorfismo de un solo nucleótido, SNP602GT, presentó 62 % de asociación con aislamientos resistentes. Se concluye que la variabilidad existente en las localidades cercanas a Toluca, definen mayor amplitud del centro de origen.

Keywords: *Phytophthora infestans*; *Phytophthora mirabilis*; RPA 190; Half maximal effective concentration (EC₅₀)

Introducción

Los datos más recientes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT 2013), señalan que a nivel mundial el cultivo de papa es el tercer producto de mayor consumo (34.17 kg/persona/año), después del trigo y del arroz. *Phytophthora infestans*, es un patógeno de gran importancia en el cultivo, es el agente causal del tizón tardío (Agrios 2005). El manejo de las enfermedades incluye desde prácticas agronómicas, resistencia de plantas, la aplicación de químicos que inhiban el desarrollo del patógeno, entre otros. Para el control del tizón tardío, los agricultores dependen en gran medida de agroquímicos, la aparición de cepas de *P. infestans* insensibles es posiblemente el resultado de altas tasas de mutación en el patógeno (Randall et al. 2014).

El metalaxil fue uno de los primeros químicos con especificidad a los oomicetos, poco después de su introducción y uso generalizado, surgieron cepas resistentes; uno de los primeros registros se reportó en Países Bajos en 1980 (Davidse et al. 1981). Después de esa fecha, se han realizado numerosos estudios de caracterización de poblaciones del oomiceto, siendo la resistencia un aspecto a evaluar. En México, la

resistencia del patógeno al metalaxil se ha reportado desde 1983, en diferentes regiones agrícolas de los estados de Chiapas, Coahuila, Estado de México, Michoacán, Puebla, Veracruz y Sinaloa (Matuszak et al. 1994), particularmente en el Valle de Toluca, Edo. de México (Grünwald y Flier 2005), no solamente aislados del cultivo de papa, se han encontrado cepas resistentes en plantas silvestres en los sitios de Chapingo (1984) y Toluca (1983) (Matuszak et al. 1994). Por más de tres décadas se han buscado las proteínas específicas que condicionan la insensibilidad a metalaxil; estudios recientes, la asocian con las variaciones en la subunidad larga de la ARN polimerasa I (ARN polI) (Randall et al. 2014).

Considerando los impactos continuos y negativos de *P. infestans*, entender su biología y la de las especies mexicanas *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* del clado 1c, es imperativo para establecer nuevas estrategias de manejo. Con base en la hipótesis que la variabilidad de las especies mexicanas *P. infestans*, *P. mirabilis* y *P. ipomoeae* podría no estar restringida al Valle de Toluca, geográficamente la variabilidad puede ser más amplia, este estudio se realizó para: 1) determinar la variación fenotípica *in vitro* de la resistencia al metalaxil en diferentes localidades del altiplano mexicano, 2) analizar la relación entre el polimorfismo del gen que codifica para la subunidad *RPA 190* de la ARN polI y la respuesta fenotípica *in vitro* de la resistencia a metalaxil, y 3) proponer un supuesto que explique el pasado evolutivo de las dos especies *P. infestans* y *P. mirabilis*, a través de un análisis filogenético de la subunidad *RPA 190* de la ARN polI.

Materiales y métodos

Muestreo

Durante el verano del 2015 se colectaron 131 aislamientos en 9 localidades, de los estados de Estado de México, Michoacán, Puebla y Tlaxcala; el rango del número de muestras colectadas por sitio fue de 1 a 45 (Figura 1, cuadro 1).

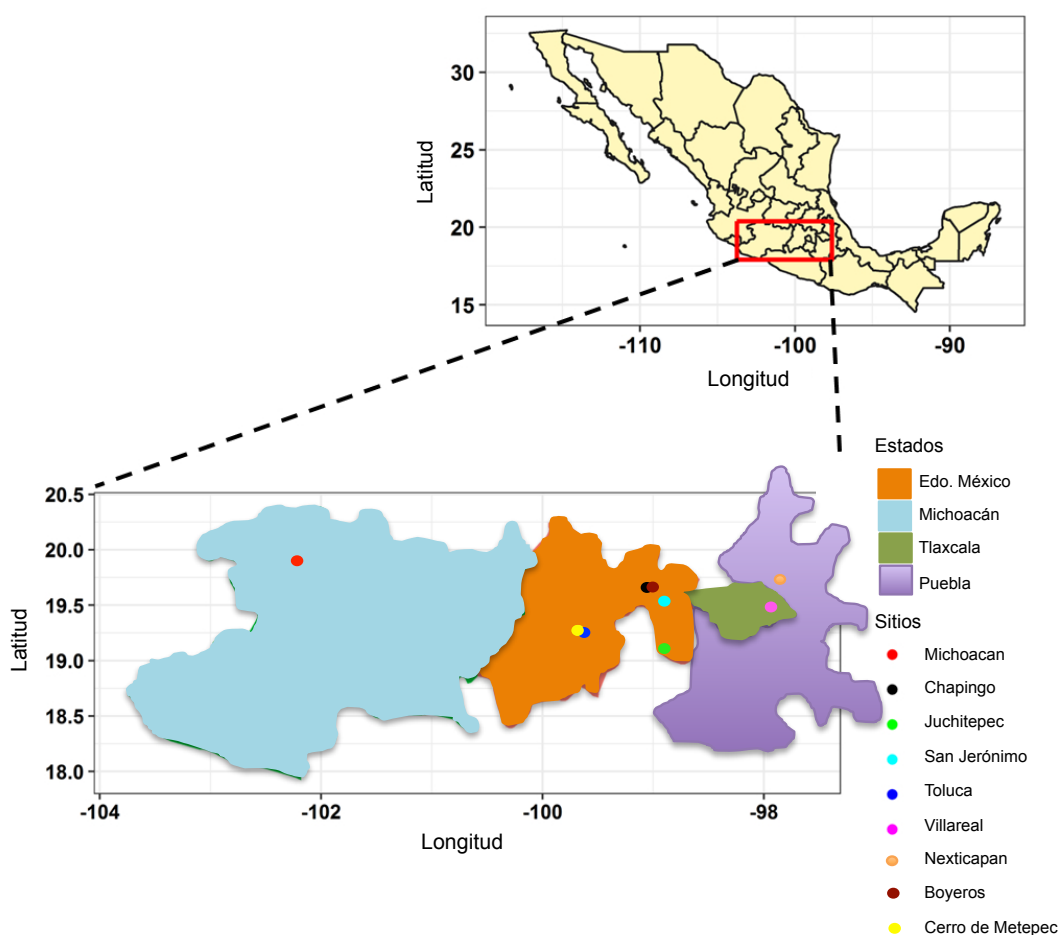


Figura 1. Sitios de muestreo. Los círculos de colores representan los lugares donde se colectaron los individuos de las especies *P. infestans* y *P. mirabilis* (Adaptado de Shankar et al., 2018).

Cuadro 1. Detalle de los aislamientos caracterizados fenotípicamente en el estudio.

Localidad (Municipio, Estado)	Código	Hospedante: órgano afectado (variedad o cultivar)	Total de aislamientos
Toluca (Metepec, Edo. Mex)	T	Papa: hoja (Gigant)	9
	Tt	Papa: tallo (Gigant)	
Chapingo (Texcoco, Edo. Mex)	ChCI	Papa: hoja (clon)	45
	ChG	Papa: hoja (Gigant)	
	ChO	Papa: hoja (Gigant-orgánico)	
	JCh	Jitomate: hoja (Cherry)	3
	JB	Jitomate: hoja (Bola)	
	JC	Jitomate: hoja (Clon)	
Nexticapan (Zacapoaxtla, Puebla)	NFt	Papa: Tallo (Fiana)	3
	NFh	Papa: hoja (Fiana)	
Villarreal (Terrenate, Tlaxcala)	TG	Papa: hoja (Gigant)	34
	TL	Papa: hoja (Lady Rosettat)	
	TF	Papa: hoja (Fiana)	
Juchitepec (Juchitepec, Edo. Mex)	JFh	Papa: hoja (Fiana)	11
	JFt	Papa: tallo (Fiana)	
San Jerónimo (Texcoco, Edo. Mex)	SGFt	Papa: tallo (Fiana)	10
	SGF	Papa: hoja (Fiana)	
Cerro de Metepec(Metepec, Edo. Mex)*	MC		2
Boyereros (Texcoco, Edo. Mex)*	MB	<i>Mirabilis jalapa</i> : hoja	13
Michoacán (Michoacán)*	Pmir(mich)		1
TOTAL AISLAMIENTOS			131

*Aislamientos de *P. mirabilis*

Obtención de los aislamientos

***P. infestans*:** Se colectaron hojas (Figura 2A) y tallos con síntomas de tizón tardío. Cada aislamiento se obtuvo de seleccionar al azar una lesión simple de un foliolo de una hoja de papa, se desinfectó el material vegetal con cloro comercial (2 % de hipoclorito de sodio) por 3 min, y se enjuagó con agua destilada. Las muestras se colocaron sobre papel aluminio en cámara húmeda de 24 a 36 h (Figura 2B). En condiciones de asepsia se colocó sobre la lesión simple del foliolo (Figura 2c) una rodaja (grosor de ≈ 0.5 cm) de tubérculo de papa cv Alpha sano y desinfectado con cloro comercial (2 % de hipoclorito de sodio) por 15 min. El micelio se desarrolló sobre la rodaja entre 36 a 48 h en cámara húmeda a 18 °C, en oscuridad (Figura 2D) y se transfirió a medio selectivo de agar-centeno (Figura 3) (Grünwald et al. 2001).

***P. mirabilis*:** Se colectaron hojas con necrosis inicial en *Mirabilis jalapa* (4A), con esporulación en el envés (Figura 4B). Cada aislamiento se obtuvo de seleccionar al azar una lesión simple en la hoja, se desinfectaron las hojas colectadas en 0.5 % de hipoclorito de sodio por 3 min, se enjuagó dos veces con agua destilada. En condiciones de asepsia, se colocaron las hojas en cámara húmeda por 48 h, tiempo en el que se desarrolló micelio sobre el envés de las hojas. Se sembraron pedazos de tejido foliar, con esporulación, en medio de cultivo Agar-centeno (Grünwald et al. 2001).

Resistencia in vitro al metalaxil

En condiciones *in vitro* se evaluaron 131 aislamientos (115 *P. infestans*, 16 *P. mirabilis*) expuestos a 4 concentraciones diferentes de metalaxil (0, 10, 50 y 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$). De cada uno de los aislamientos, se tomó un fragmento de 5 mm de diámetro de los bordes del micelio de 15 días (crecidos en medio de agar-centeno) y se transfirió a caja Petri de 60 mm de diámetro con medio de agar-centeno, las cajas se incubaron por 10 días, a 18 °C. De cada caja, se realizaron dos mediciones perpendiculares del diámetro de crecimiento del micelio. La media del crecimiento radial de dos cajas Petri (cuatro mediciones) se calculó para cada concentración. Para determinar la categoría de sensibilidad del patógeno a metalaxil, se utilizó el porcentaje de crecimiento en la dosis de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Daayf et al. 2001), se consideraron como aislamientos sensibles al metalaxil (SM) cuando el porcentaje de crecimiento fue menor del 10 %, intermedios al metalaxil (IM) cuando el crecimiento estuvo en el rango de 10 %-60 % y resistentes al metalaxil (RM) cuando el porcentaje de crecimiento fue mayor al 60 %.

$$\text{Porcentaje de crecimiento} = 100 \frac{(\bar{x} \text{ del diámetro de crecimiento dosis } 100 \mu\text{g mL}^{-1}) - 5\text{mm}}{(\bar{x} \text{ del crecimiento en el testigo dosis } 0 \mu\text{g mL}^{-1}) - 5\text{mm}}$$

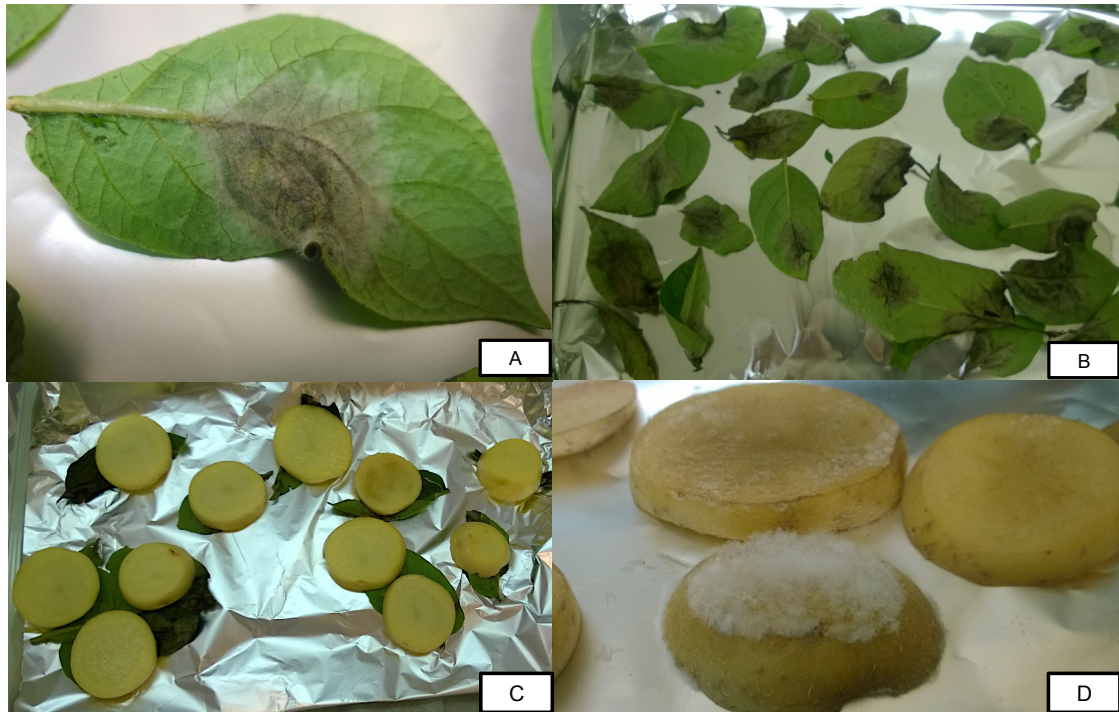


Figura 2. Aislamiento de *P. infestans*. A y B esporulación en cámara húmeda, C) inoculación en rodaja de papa. D) crecimiento sobre rodaja de papa (Anexo 1).

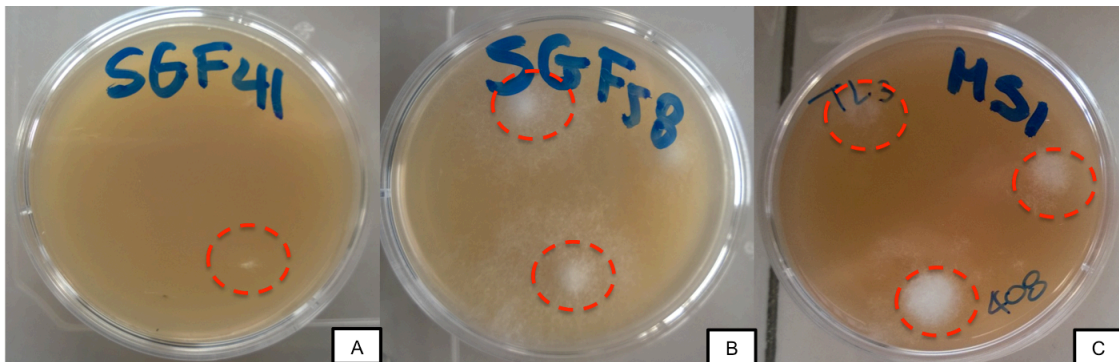


Figura 3. Crecimiento de *P. infestans* en medio selectivo de agar-centeno. A: 14 días posterior a la transferencia, B: 21 días, C: 21 días, medio agar-centeno con antibióticos (Grünwald et al 2001).

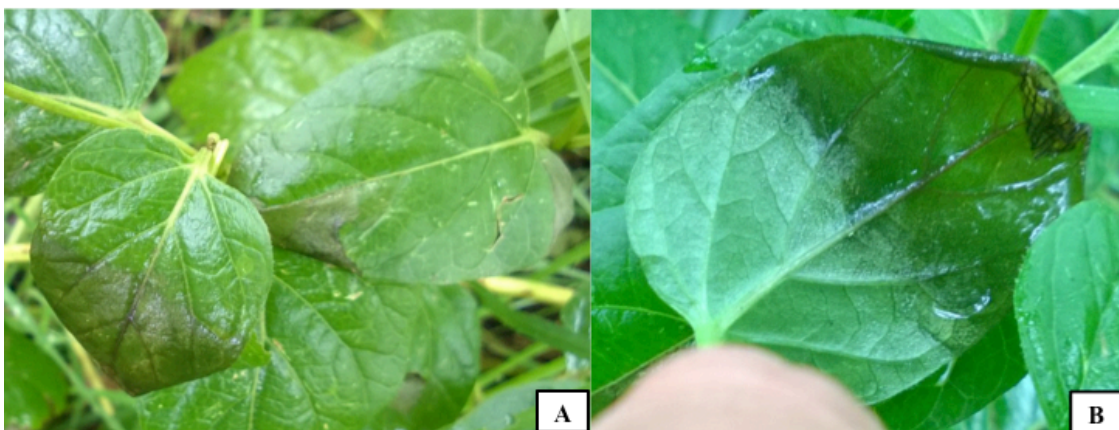


Figura 4. Síntomas de tizón en *M. jalapa*. A: Haz de hojas. B: envés de la hoja con esporulación.

Análisis de concentración efectiva media (CE_{50})

La concentración efectiva media (CE_{50}) se define como la concentración de metalaxil necesaria para inhibir el 50 % del crecimiento de micelio *in vitro* de cada aislamiento. La CE_{50} se estimó mediante un modelo de regresión lineal entre el logaritmo de las cuatro concentraciones de metalaxil (0, 10, 50 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) y porcentaje de inhibición transformado a unidades Probit, utilizando análisis Probit de SAS con un límite de confianza de 95 % (Statistical Analysis System, v. 9.0).

Extracción de ADN

Se seleccionaron 56 aislamientos (49 de *P. infestans* y 7 de *P. mirabilis*) para el análisis molecular. El ADN se extrajo de micelio de 21 días, crecido en medio de cultivo agar-centeno, se utilizó el kit DNAeasy (Quiagen® kit), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. La calidad del ADN, se verificó por electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) (Ultrapure, Invitrogen®) y se cuantificó empleando técnicas espectrofotométricas (NanoDrop2000), mediante medida de la absorbancia a 260 nm.

Amplificación y secuenciación de la región que codifica la subunidad RPA 190

Mediante PCR se amplificó la región que codifica para la subunidad RPA 190, 708 pb, se utilizaron los primers G1 (5'-GCAAATTCTTCCTGAACGTGATCC forward, 5'-ACACCACATCACCAGTCTTCAG reverse). El programa de PCR fue: predesnaturalización a 94 °C por 1 min, desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación de 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, y 30 s a 72 °C y el periodo de terminación 72 °C por 10 min (Matson et al., 2015). Los productos de PCR se secuenciaron en el laboratorio MacroGen®, Corea del Sur. Las secuencias obtenidas en este estudio se compararon con secuencias de organismos de referencia, a través de la base de datos BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Estados Unidos), se encontró 99 % de similitud con una región de las accesiones XP_002906895.1 y XM_002906849.1, que corresponden al gen que codifica para ARN polimerasa I, subunidad RPA190 (5540 pb) de *P. infestans*.

Alineamiento de secuencias

ADN: se alinearon 651 posiciones de nucleótidos de las 57 secuencias (56 secuencias de este estudio y una secuencia tipo obtenida del GenBank, accesión XM_002906849.1 que codifica para ARN polimerasa I, subunidad RPA190 de *P. infestans*). El alineamiento múltiple se generó con Muscle (Edgar 2004), usando el software MEGA 7 (Kumar et al. 2016), se ajustaron manualmente para permitir la máxima similitud de secuencias.

Aminoácidos: las secuencias de aminoácidos (217 posiciones) se obtuvieron de traducir las secuencias de nucleótido utilizando el programa MEGA 7 (Kumar et al. 2016). Se realizó la alineación utilizando Muscle (Edgar 2004). El alineamiento múltiple se generó con Muscle (Edgar 2004), usando el software anterior.

Análisis Filogenéticos

La historia evolutiva se infirió utilizando el método UPGMA (del inglés: *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), método de agrupamiento de pares para elaborar un dendrograma a partir de una matriz de distancia, empleando un algoritmo de agrupación secuencial en el cual los promedios se ponderan por el número de taxones en cada *cluster* en cada paso, por tanto cada distancia contribuye equitativamente en el resultado final (Sneath y Sokal 1973). La diferencia con el método WPGMA (del inglés: *Weighted Pair Group Method with Averaging*) consiste en que en el algoritmo utilizado en este último, la distancia entre los *clusters* se calcula con un promedio simple. Para generar el árbol consenso en el análisis *bootstrap* se utilizaron 100 repeticiones (Felsenstein 1985). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud con el coeficiente p-distance (Tamura et al. 2004) en el caso de las secuencias de nucleótidos y el método de corrección de Poisson (Zuckerkandl y Pauling 1965) para las secuencias de aminoácidos. El análisis involucró 57 secuencias de nucleótidos y 50 secuencias de aminoácidos. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA 7 (Kumar et al. 2016).

Resultados y discusión

Porcentaje de crecimiento en diferentes concentraciones

Se expresó como porcentaje de crecimiento (PC) al desarrollo radial del micelio crecido en medio de agar-centeno en las tres concentraciones de metalaxil (10, 50 y 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), con respecto al control (0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) (Figura 5A). Las barras del histograma representan 0-14 %, 15-28 %, 29-42 %, 43-56 %, 57-70 %, 71-84 %, 85-100 % de los valores del control. A la dosis de 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, el 54.2 % de los aislamientos tuvieron un PC de más de 71 % (Figura 5B). A la dosis de 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, el pico fue en el PC de 71-84 %, (Figura 5C) y en la dosis de 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, el pico se recorrió al PC 57-70 % (Figura 5D).

Categorías de resistencia de *P. infestans* a metalaxil

Algunos autores consideran a los aislamientos sensibles, si el porcentaje de crecimiento del aislamiento expuesto a la concentración 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de metalaxil comparado con el testigo (0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) es menor o igual al 10 %; y resistentes si el porcentaje de crecimiento es mayor al 10 % (Peters et al. 1999). En otros estudios, si el porcentaje de crecimiento del aislamiento expuesto a la concentración 5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de metalaxil comparado con el testigo (0 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) es mayor de 40 % se categorizan como resistentes y los que crecen menos de 40 % como sensibles (Peters et al. 2014).

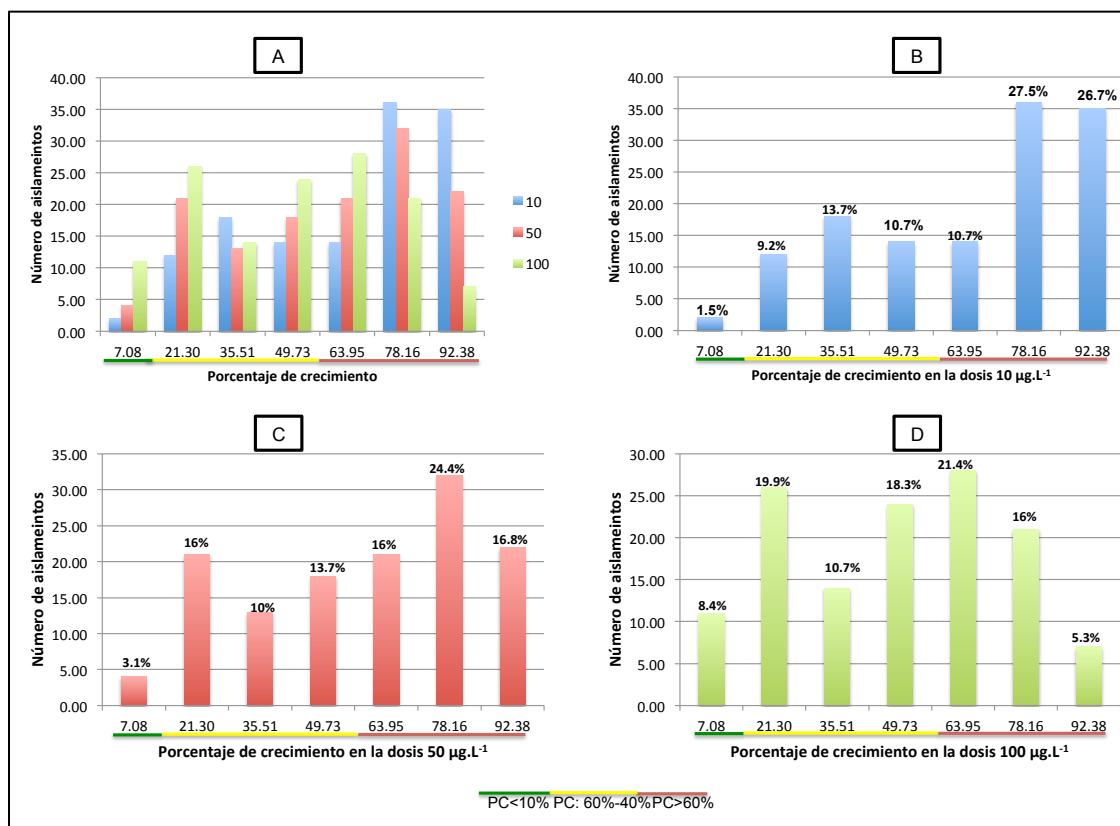


Figura 5. Histogramas del porcentaje de crecimiento en las diferentes dosis de metalaxil. A) PC comparativo de las tres dosis, B) PC en la dosis 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, C) PC en la dosis 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, y D) PC en la dosis 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

A nivel mundial, la frecuencia relativa (en porcentaje) de los aislamientos resistentes a metalaxil en la población, varía ampliamente; por ejemplo en Polonia 14.5 % (Śliwka et al., 2006), en China 23.53 % en aislamientos de tomate (Zhu et al. 2008), 23.9 % en Finlandia (Śliwka et al. 2006), Costa Rica 64 % (Páez et al. 2001), 71.8 % en Noruega (Hermansen et al. 2000), 84 % en Perú (Perez et al. 2001) a 100 % en Chile (Riveros et al. 2003). En México, en las zonas paperas de este estudio (Figura 6) el 100 % de los aislamientos de Nexticapan, PUE., mostraron resistencia al metalaxil, en Juchitepec, MEX. el 64 %; y en el Valle de Toluca el 11 % de los individuos. En Chapingo el 49 % de los aislamientos mostraron

resistencia, aún cuando no se produce extensamente el cultivo de papa, sin embargo las condiciones climáticas son ideales para el tubérculo y para el desarrollo de tizón tardío en el verano (Díaz-de la Cruz et al. 2014).

P. mirabilis se reportó por primera vez en Chapingo (Galindo y Hohl 1985). En este estudio no se encontraron aislamientos resistentes al metalaxil de esta especie, sin embargo en la localidad de Boyeros, Texcoco (2 Km de distancia de Chapingo) el 31 % presentaron sensibilidad intermedia al metalaxil (IM) (Figura 6). En las otras dos localidades, Michoacán y Cerro de Metepec, todos los aislamientos de *P. mirabilis* fueron sensibles al metalaxil.

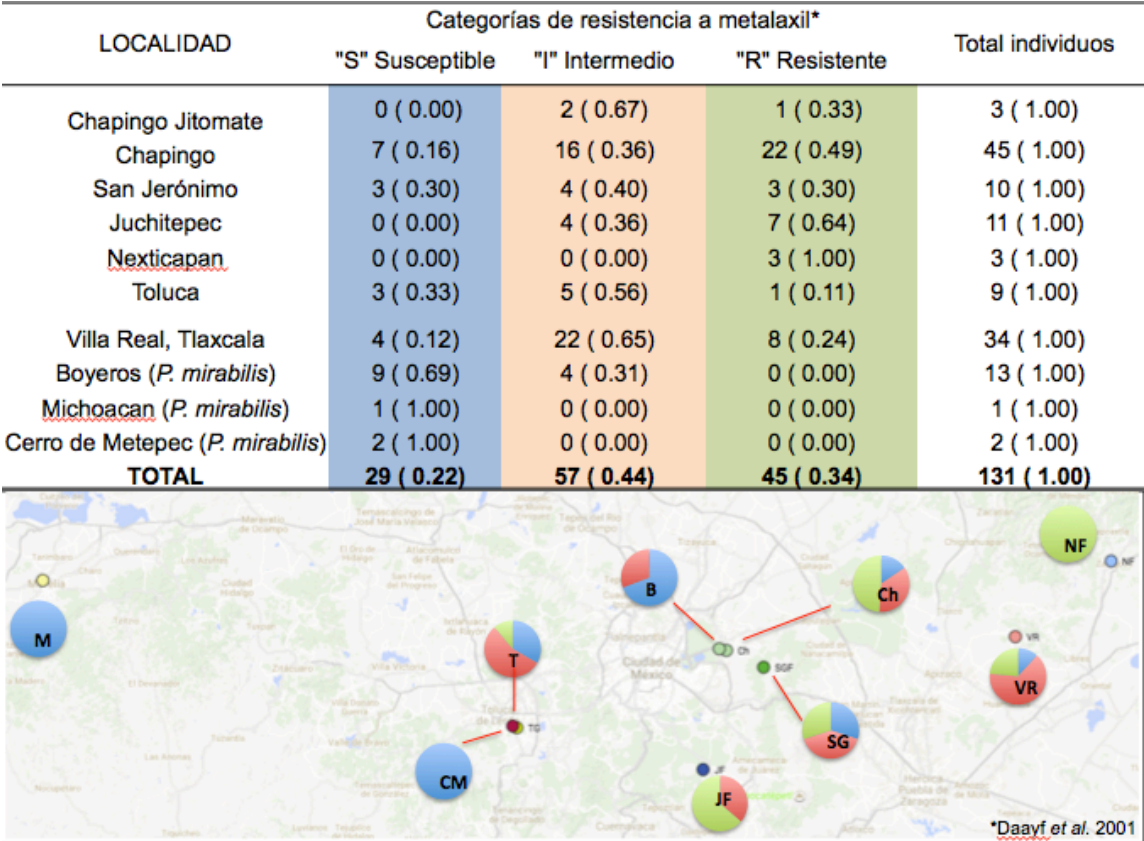


Figura 6. Categorías de resistencia al metalaxil por localidades. El 34 % de la población total evaluada presentó resistencia al metalaxil, en Nexticapan la frecuencia fue mayor y en Toluca la menor, de los aislamientos de *P. infestans*. Los aislamientos de *P. mirabilis* presentaron sensibilidad al metalaxil en el Cerro de Metepec y en Michoacán, el 31 % resistencia intermedia (RI) en Boyeros.

Concentración efectiva media (CE₅₀)

A nivel mundial, en *P. infestans* los valores reportados de CE₅₀ de metalaxil son variables, inclusive en la misma localidad. En Serbia aislamientos con sensibilidad intermedia presentaron valores de 0.3 a 3.9 µg.ml⁻¹ (Rekanović et al. 2012), en China aislados resistentes de tomate sobre los 500 µg.ml⁻¹ (Zhu et al. 2008), en Costa Rica, aislados resistentes, 370 a 1527 µg /ml (Páez et al. 2001); en Chile el valor entre 243 y 687 µg.ml⁻¹, 200 veces superior a la CE₅₀ estimada en aislamientos sensibles (Riveros et al. 2003). Se pudo calcular la CE₅₀ para 107 aislamientos. Dentro de cada localidad existió amplia variabilidad en los valores. En el Valle de Toluca, Grünwald et al., (2006) refirieron variación de logCE₅₀ de 10⁻² a 10³ µg.ml⁻¹ (Figura 7) estos valores están relacionados con los encontrados en el presente estudio que fueron de logCE₅₀ de 10⁻¹ a 10⁻³, no se realizaron análisis para cada localidad.

Análisis filogenético

Dendrograma basado en la secuencia de nucleótidos *RPA 190*

En el dendrograma, en el corte B (Figura 8), a la distancia de 0.0034 (p-distance), se obtienen dos grupos que comparten un ancestro en común: el grupo de *P. infestans* (49 individuos más el de control) y el de las 7 *P. mirabilis*. En el grupo de los 49 aislamientos de *P. infestans* existió además un Evento 1 (Figura 8) donde se forman dos grupos monofiléticos grandes (1a – 6a *resistentes*) y (1c - 5c *sensibles*), en el primer grupo están 27; los aislamientos con resistencia (18) e intermedios (9), en el segundo grupo 22 aislamientos (1b-5b), intermedios (14), sensibles (8) (Figura 9). En la línea de corte A (Figura 8), a una distancia genética de 0.0006 se forman **14 grupos**. En el grupo de los *resistentes* se forman **6 grupos** (1a-6a), 3 grupos con un solo individuo, 2a(RM), 3a(RM), y 4a (aislamiento control); el grupo 1a con 19 individuos RM y 7 IM, el grupo 5a, dos individuos RM, y el 6a con dos RM y dos IM. En el grupo de los *sensibles*, **5 grupos**, 4 de ellos con un sólo individuo, 1b (IM), 2b (IM), 3b (IM) y 4b (SM). El grupo 5b 7 SM, 11 IM. En la especie *P. infestans*, no se encontraron grupos con respecto a la localidad, en *P. mirabilis*, se formaron **3 grupos**, uno es el de Cerro de Metepec, otro el de Michoacán y el tercer grupo lo constituyen los 5 individuos que pertenecen a Boyeros.

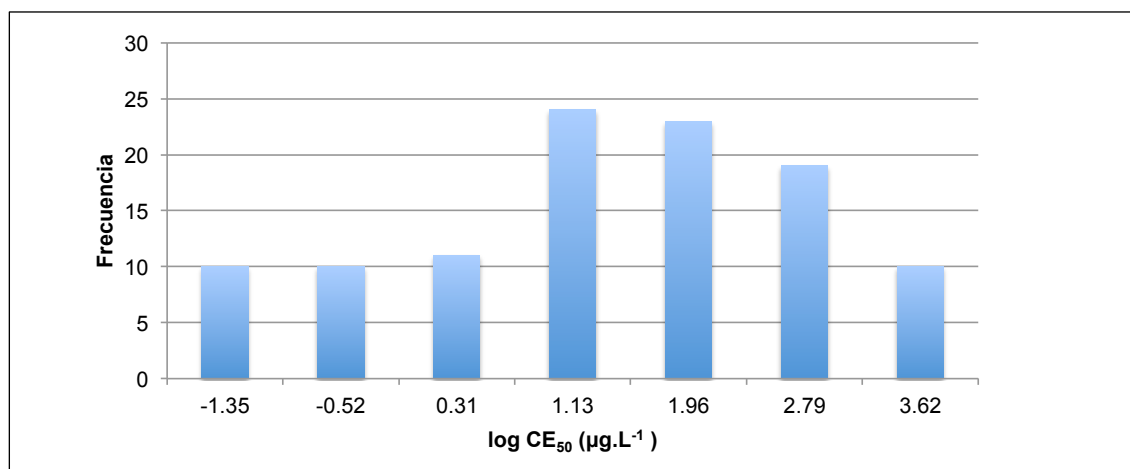


Figura 7. Histograma del logaritmo de CE₅₀ de metalaxil en los aislamientos evaluados. El rango de variación es de 10⁻² a 10³ µg.ml⁻¹ teniendo una frecuencia alta en 1.13 a 1.96 µg.ml⁻¹.

Dendrograma basado en la secuencia de aminoácidos *RPA 190*

En el dendrograma, en el corte B (Figura 10) a la distancia de 0.0027 (p-distance), se obtienen dos grupos monofiléticos, que comparten un ancestro en común. El primer grupo 1b, 18 aislamientos RM, y 10 IM. En el grupo 2b, 13 aislamientos IM, y 8 SM. En la línea de corte A (Figura 10) a una distancia genética de 0.0022 se forman **7 grupos**. Existen 4 grupos con un solo individuo, 2a (control), 3a, 5a y 6a. En el grupo **1a** (Figura 11), se formó con 21 individuos: 13 RM y 8 IM. El grupo **4a**, 6 individuos de localidades Nixticapan, Juchitepec y San Gerónimo que se aislaron de muestras de tallo, 4 aislamientos son RM y dos IM, 4 grupos con un solo individuo, 2a (aislamiento control), 3a (RM), 5a (IM) y 6a (IM); el grupo **7a** (Figura 11) con 19 individuos RM y 7 IM.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)

Se alinearon 50 secuencias de nucleótidos (49 *P. infestans* de este estudio y 1 aislamiento control). Se detectaron **12 polimorfismos (SNPs)** en las 651 posiciones o pares de bases, que originaron 60 mutaciones de punto. Las mutaciones de punto fueron 26 transiciones, 31 transversiones y 3 GAPS (Cuadro 2). En **5 SNPs** (posiciones 15, 270, 303, 417, 594), se produjo una mutación silenciosa en la secuencia de aminoácidos (Aa), no existió cambio al momento de la traducción a aminoácido. En **4 SNPs** (posiciones: 2, 21, 77 y 251) existió cambio de Aa. En **2 SNPs** (posiciones: 7 y 28) no fue posible la traducción a Aa. Un **SNP**, posición 201, produjo 21 transversiones, se sustituyó Guanina (G) por Timina (T), esta sustitución originó el cambio de Serina por Isoleucina en 21 individuos que corresponden al grupo 1a, en donde se encuentran los individuos que mostraron resistencia al metalaxil (62 %) e intermedia (38 %) (Figura 11).

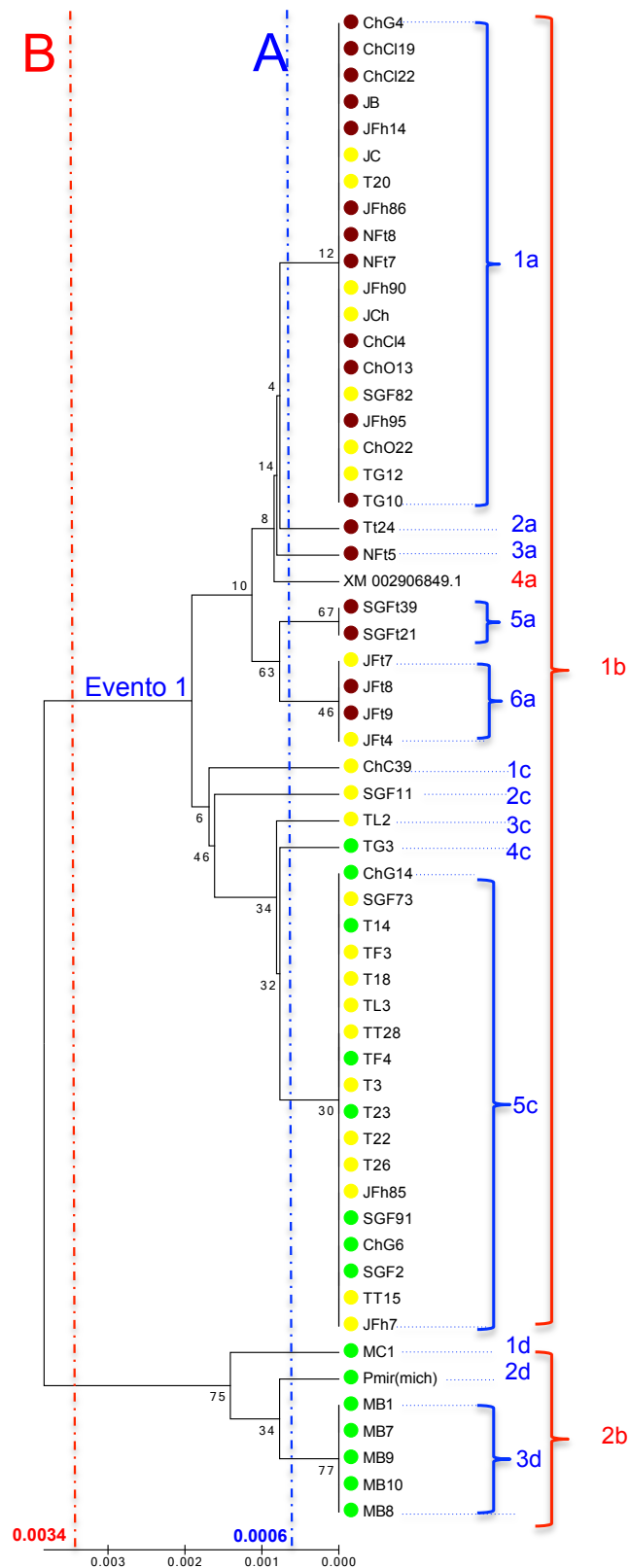


Figura 8. Análisis filogenético basado en la secuencia de nucleótidos *RPA 190* (SM verde, IM amarillo, RM rojo), estilo tradicional rectangular, método UPGMA.

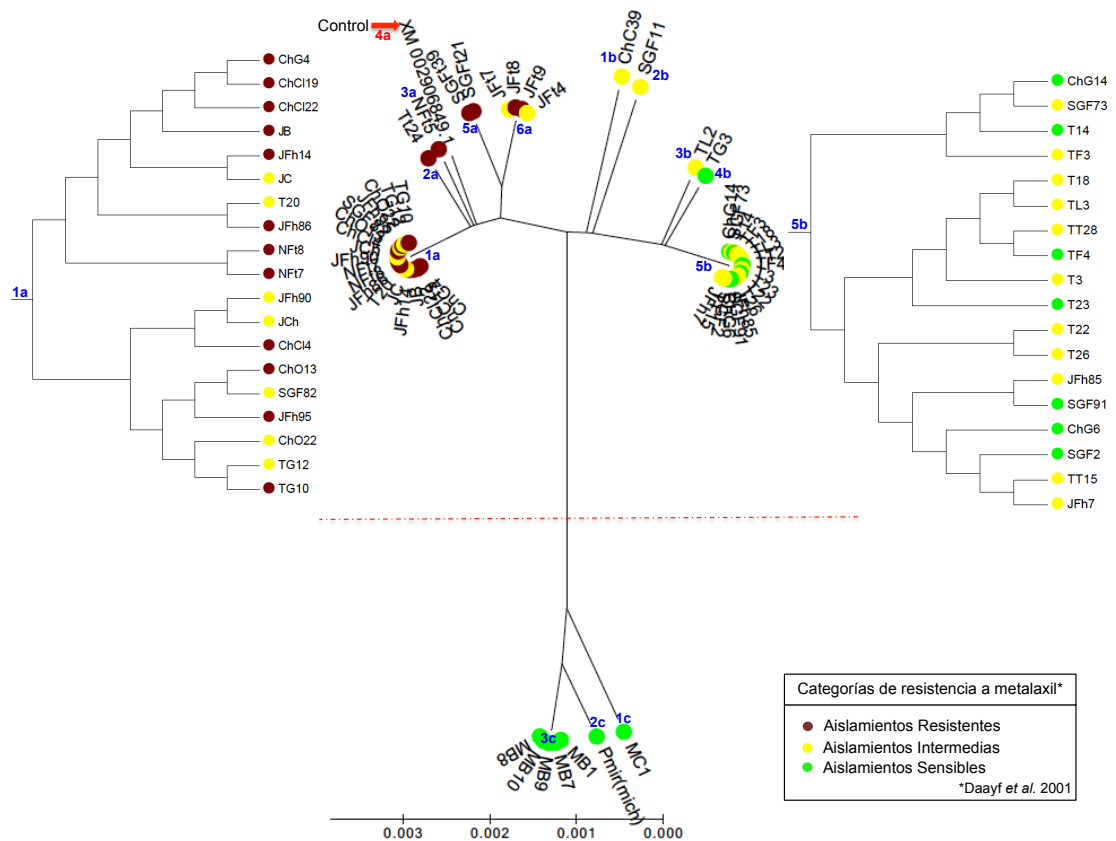


Figura 9. Análisis filogenético basado en la secuencia de nucleótidos *RPA 190* (SM verde, IM amarillo, RM rojo), estilo radial método UPGMA

Cuadro 2. Polimorfismos en el fragmento que codifica para la subunidad *RPA190*

Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)					Cambios en la traducción de Aminoácidos			
50 secuencias	651 nucleótidos alineados					217 Aminoácidos alineados		
	Posición SNP	Nucleótido original	Nucleótido sustituto	Transiciones	Transversiones	Posición de la sustitución	Aa original	Aa sustituto
	2	48T	1G, 1C	1	1	1	48 Fenilalanina	1 Cisteína, 1 Serina
	7	48C	2 GAPS		2 GAP	3	49 Prolina	1 ?
	15	48A	2C	0	2	Sin cambio en traducción, mutación silenciosa		
	21	44G	6T	0	6	7	45 Metionina	5 Isoleucina
	28	49A	1 GAP		1 GAP	10	49 Lisina	1 ?
	77	49T	1A		1	26	49 Fenilalanina	1 Tirosina
	251	49C	1T	1	0	84	49 Treonina	1 Isoleucina
	270	29C	21T	21	0	Sin cambio en traducción, mutación silenciosa		
	303	49T	1C	1	0	Sin cambio en traducción, mutación silenciosa		
	417	49C	1T	1	0	Sin cambio en traducción, mutación silenciosa		
594	49T	1C	1	0	Sin cambio en traducción, mutación silenciosa			
602	29G	21T	0	21	201	29 Serina	21 Isoleucina	
					26	31		
12 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs)					7 posiciones de aminoácidos sustituidos			

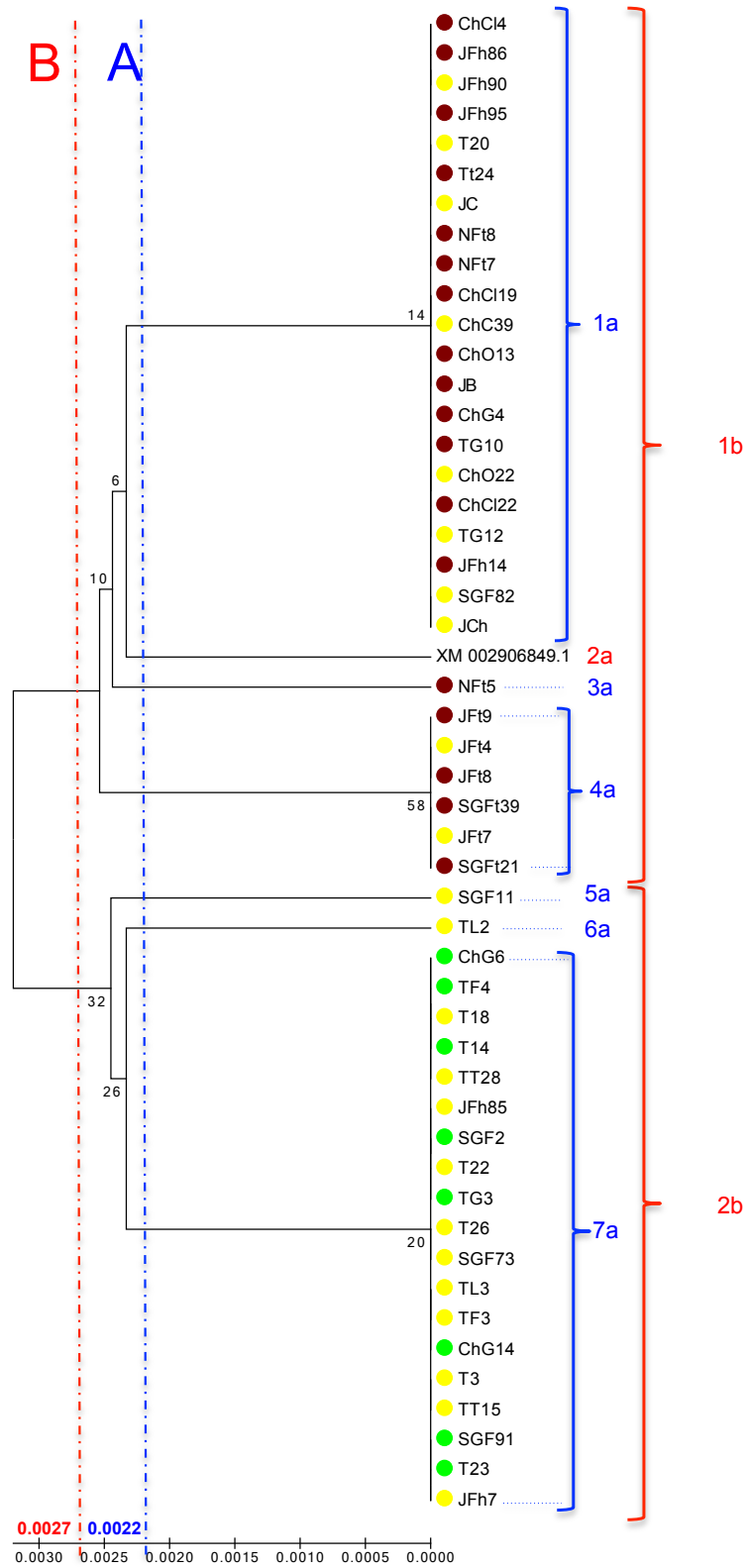


Figura 10. Análisis filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de *RPA 190* (SM verde, IM amarillo, RM rojo), estilo tradicional rectangular método UPGMA.

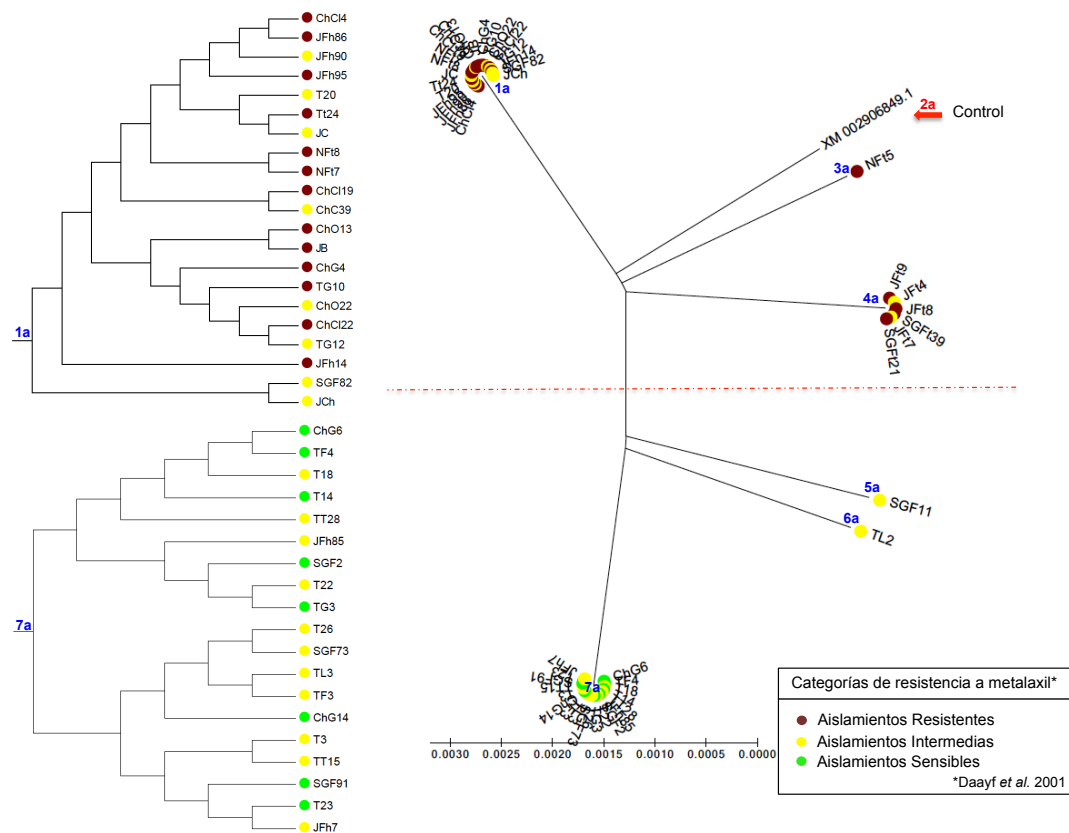


Figura 11. Análisis filogenético basado en la secuencia de aminoácidos de *RPA 190* (SM verde, IM amarillo, RM rojo), estilo radial método UPGMA.

El SNP 602 GT (posición 602, cambio de Guanina por Timina) (Cuadro 2) forma dos grupos (1a y 7a), en el 7a 62 % de los aislamientos presentan fenotipo de resistencia a metalaxil y el 38 % son intermedios al metalaxil. Randall et al., (2014), al analizar todos los SNPs del segmento completo *RPA 190* (1812 pb) encontraron que un SNP 1145 AT (posición 1145, cambio de Adenina por Timina) estuvo 86 % asociado con los aislamientos resistentes. No se puede asegurar que los polimorfismos (SNPs) afecten directamente en la síntesis de la *ARN polII*, debido a que la enzima es un complejo múltiple, en el caso de *P. infestans* son 12 subunidades, además la topoisomerasa y los factores de transcripción pueden influir en su actividad; esto complica la identificación precisa de la subunidad que es afectada por el metalaxil (Matson et al. 2015).

Conclusiones

Variación fenotípica *in vitro* de la resistencia al metalaxil, existe mayor frecuencia de aislamientos de *P. infestans* resistentes al metalaxil en las otras localidades, a diferencia de la que existe en Toluca, centro de origen del patógeno.

Polimorfismos del gen que codifica para la subunidad *RPA*, presentamos un SNP 602 GT, con 62 % de asociación con aislamientos resistentes. La ausencia de formación de grupos con respecto a las localidades, manifiesta la amplia variabilidad genética dentro de cada sitio de muestreo; se puede explicar por la presencia de los dos tipos de compatibilidad que potencian la reproducción sexual y recombinación genética en los patógenos.

Análisis filogenético, en base a la secuencias de nucleótidos del fragmento que codifica para *RPA190*, se pudo observar las dos especies *P. infestans* y *P. mirabilis* en dos grupos diferentes. La distancia genética

entre ellas fue 0.006144 (p-distance), aún cuando no se incluyeron las otras especies faltantes del clado 1c, este fragmento puede ser de utilidad para la identificación. Actualmente es complejo distinguir las especies del clado se han utilizado diversas regiones entre ellas la región *cox1* o la región orf 79 del genoma mitocondrial.

Las inconsistencias del patógeno con respecto a la resistencia/sensibilidad al metalaxil en condiciones *in vitro*, determinadas por la amplitud de los valores de CE₅₀, no explican la predictibilidad del comportamiento en las diferentes concentraciones utilizadas, sugiriendo gran plasticidad genética.

Literatura citada

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. California: Elsevier Academic Press.
- Daayf, F., H.W. Platt, G. Mahuku, and R. D. Peters. 2001. Relationships between pathotypes and RAPDs, Gpi-allozyme patterns, mating types, and resistance to metalaxyl of *Phytophthora infestans* in Canada in 1997. American Journal of Potato Research. doi:10.1007/BF02874768.
- Davidse, L. C., D. Looijen, L. J. Turkensteen, and D. Van der Wal. 1981. Occurrence of metalaxil-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. Netherlands Journal of Plant Pathology. doi:10.1007/BF01976658.
- Díaz-de la Cruz, J. B., H. Lozoya-Saldaña, J. Sahagun-Castellano and A. Peña-Lomeli. 2014). The pathosystem *Solanum tuberosum* L.-*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Chapingo. México. Expected, observed, and simulated. American Journal of Potato Research. doi: 10.1007/s12230-013-9351-y.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research. doi:10.1093/nar/gkh340.
- FAOSTAT. 2013. Statistics Division. Food and Agriculture Organization. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 24 April 2018.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution. doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.
- Galindo, J. y H. R. Hohl. 1985. *Phytophthora mirabilis*, a new species of Phytophthora. Sydowia 38: 87-96.
- Grünwald, N. J., and W. G. Flier. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. Annual Review of Phytopathology. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906.
- Grünwald, N.J., W.G. Flier, A.K. Sturbaum, E. Garay-Serrano, T. B. M. Van den Bosch, C. Smart,...and W. E. Fry. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley región of central Mexico. Phytopathology. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.9.882
- Hermansen A, A. Hannukala, R. Hafskjold-Naerstad, M. B. Brurberg. 2000. Variation in populations of *Phytophthora infestans* in Finland and Norway: mating type, metalaxyl resistance and virulence phenotype. Plant Pathology. doi: 10.1046/j.1365-3059.2000.00426.x.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Lassiter, E. S., C. Russ, C. Nusbaum, Q. Zeng, A. Saville, R. Olarte, I. Carbone, C. Hu, A. Seguin-Orlando, J. A. Samaniego, J. Thorne, and J. B. Ristaino. 2015. Mitochondrial genome sequences reveal evolutionary relationships of the *Phytophthora* 1c clade species. Current Genetics. doi:10.1007/s00294-015-0480-3.
- Matson, M. E. H., I. M. Small, W. E. Fry, and H. S. Judelson. 2015. Metalaxyl Resistance in *Phytophthora infestans*: Assessing Role of RPA190 Gene and Diversity Within Clonal Lineages. Phytopathology. doi: 10.1094/PHYTO-05-15-0129-R.

- Matuszak, J. M., J. Fernandez-Elguezabal, W. K. Gu, M. Villarreal-Gonzalez, and W. E. Fry. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: Distribution and dynamics. *Plant Disease* 78(9): 911-916.
- Páez, O., L. Gómez, A. Brenes, and R. Valverde. 2001. Resistencia de los aislamientos de *Phytophthora infestans* al metalaxil en el cultivo de la papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 29 (1): 41-55.
- Perez, W.G., J. S. Gamboa, Y. V. Falcon, M. Coca, R. M. Raymundo, and R. J. Nelson. 2001. Genetic structure of Peruvian populations of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.10.956.
- Peters, R. D., K. I. Al-Mughrabi, M. L. Kalischuk, K. F. Dobinson, K. L. Conn, H. Alkher, M. R. Islam, F. Daayf, J. Lynn, B. Bizimungu, D. De Koeyer, C. A. Lévesque and L. M. Kawchuk. 2014. Characterization of *Phytophthora infestans* population diversity in Canada reveals increased migration and genotype recombination. *Canadian Journal of Plant Pathology*. doi: 10.1080/07060661.2014.892900.
- Peters, R. D., H. W. Platt, R. Hall, and M. Medina. 1999. Variation in aggressiveness of Canadian isolates of *Phytophthora infestans* as indicated by their relative abilities to cause potato tuber rot. *Plant Disease*. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.7.652.
- Randall, E., V. Young, H. Sierotzki, G. Scalliet, P. R. Birch, D. E. L. Cooke, M. Csukai, and S. Whisson. 2014. Sequence diversity in the large subunit of RNA polymerase I contributes to Mefenoxam insensitivity in *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology*. doi:10.1111/mpp.12124.
- Rekanović, E., I. Potočnik, S. Milijašević-Marčić, M. Stepanović, B. Todorović, and M. Mihajlović. 2012. Toxicity of metalaxyl, azoxystrobin, dimethomorph, cymoxanil, zoxamide and mancozeb to *Phytophthora infestans* isolates from Serbia. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. doi: 10.1080/03601234.2012.657043.
- Riveros, F. B., R. Sotomayor, V. Rivera, G. Secor, and B. Espinoza. 2003. Resistencia de *Phytophthora infestans* (Montagne) de Bary a metalaxil, en el cultivo de papas en el norte de Chile. *Agricultura Técnica*. doi: 10.4067/S0365-28072003000200001.
- Shankar, K. S., M. M. Larsen, M. M. Cuenca-Condoy, H. Lozoya-Saldaña, and N. J. Grünwald. 2018. Variation in genetic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Mexico from the center of origin outwards. *Plant Disease*. doi: 10.1094/PDIS-11-17-1801-RE.
- Śliwka, J., S. Sobkowiak, R. Lebecka, J. Avendaño-Córcoles, and E. Zimnoch-Guzowska. 2006. Mating type, virulence, aggressiveness and metalaxyl resistance of isolates of *Phytophthora infestans* in Poland. *Potato Research*. doi:10.1007/s11540-006-9013-2.
- Sneath P. H. A. and Sokal R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco: Freeman.
- Tamura K., M. Nei, and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. doi: 10.1073/pnas.10111030-11035.
- Zhu, G., F. Huang, I. Feng, B. Qin, Y. Yang, Y. Chen, and X. Lu. 2008. Sensitivities of *Phytophthora infestans* to metalaxyl, cymoxanil, and dimethomorph. *Agricultural Sciences in China*. doi: 10.1016/S1671-2927(08)60120-0.
- Zuckerkindl E., and L. Pauling. 1965. *Evolutionary divergence and convergence in proteins*. New York: Academic Press.

**CAPÍTULO III. PRIMER REPORTE DE *Phytophthora ipomoeae*
OCASIONANDO TIZÓN TARDÍO EN HOJAS DE PAPA EN EL
CENTRO DE MÉXICO**

**CHAPTER III. FIRST REPORT OF *Phytophthora ipomoeae*
CAUSING LATE BLIGHT IN POTATO FOLIAGE IN CENTRAL
MÉXICO**

Disease note

Historically, the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary has been the only species associated with potato late blight (Pérez and Forbes, 2008). *P. ipomoeae* is a species closely related to *P. infestans* (Flier et al. 2002) and causes blight in *Ipomoea longipedunculata*. We report here for the first time that *P. ipomoeae*, in a mixed infection with *P. infestans*, was found attacking potato (*Solanum tuberosum* L.). *P. ipomoeae* was identified in the summer of 2015 in two potato fields; one field where 40 % of cv. Lady Rosetta plants showed late blight symptoms (Villarreal, State of Tlaxcala, 19°28'37"N 97°55'07" W, 3104 m above sea level (masl)), and in another field where 30 % late blight affected *P. infestans*-resistant clone 94-03-08 plants were present (Chapingo, Texcoco, State of México, 19°29'23" N 98°53'37" W, 2240 masl). Foliar symptoms in the two fields were typical of late blight (Pérez and Forbes, 2008). Fifteen and 27 single lesion potato leaves were randomly collected from the Villarreal and Chapingo fields respectively. The leaves were placed into moist chambers, followed by the placement of a surface-sterilized potato slice over each lesion. After 36-48 hr, mycelia emerging from the slice was plated on a selective rye-agar medium (Grünwald et al. 2001). In vitro morphological studies were carried out using 50 measurement on each of the 2 isolates, one isolate per leaf. The morphology of only two of the isolates, one from each region, was consistent with that of *P. ipomoeae* (Flier et al., 2002). Sporangioophores were of continuous growth and sympodial ramification, sporangia semipapillate, ellipsoid-ovoid shaped, expired with a short pedicel, length of sporangia varied from 19.4 to 51.4 μ m (mean 37.3 μ m), sporangial width was from 11.4 μ m to 24.5 μ m (mean 19.0 μ m), mean length of the papillae of sporangia was 3.1 μ m, length/width ratio of sporangia was 1.9 μ m to 1.6 μ m. The morphology of the remaining 40 isolates was consistent with that of *P. infestans* (Pérez and Forbes, 2008). DNA from the two *P. ipomoeae* isolates, along with 16 *P. infestans* isolates representing both locations was extracted (DNA easy Quiagen® kit). The internal transcribed spacer rDNA regions were amplified

using the universal primers ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), and were sequenced by MacroGen®, Korea. The sequences were BLAST analyzed in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA). The sequences (899 bp) of the two isolates morphologically identified as *P. ipomoeae* had 99 % similarity with accessions KF777191.1, AY770742.1 and FJ801323. The sequences were submitted to GenBank with accession number MF196916.1 (Chapingo), and MF196917.1 (Villarreal). The sequences of the 16 putative *P. infestans* cultures along with the morphological data, confirmed their identity as this species. The two *P. ipomoeae* isolates were cultured on rye-agar for 10 to 14 days. Sporangial suspensions (2.4×10^4 sporangia.ml⁻¹) were prepared from the plates and exposed to 4 °C for 2 hours to release zoospores. The zoospore suspensions were spray inoculated onto the leaves of 28 day old potato plants, cv. Fianna. The plants were incubated at 18-22 °C and 65-75 % relative humidity, and 12 hr day length. Blight symptoms were evident 48-72 hr after inoculation. The oomycete was successfully re-isolated and morphologically identified as *P. ipomoeae*. Our study showed that it is likely that late blight lesions in potato fields can be caused by a mixture of several *Phytophthora* species, not only by *P. infestans*. This would make disease management and the identification of resistance cultivars challenging.

References

- Flier, W. G., et al. 2002. Mycological Research, 106:848-856
- Grünwald, N. J. et al. 2001. Phytopathology 91:882-890.
- Pérez, W., and Forbes, G. 2008. Manual técnico: El tizón tardío de la papa. CIP, Lima, Perú

ANEXO 1. PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO DE *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, DE SÍNTOMAS DE TIZÓN TARDÍO EN PAPA (*Solanum tuberosum*)

ACTIVIDADES EN CAMPO

Colección de síntomas: coleccionar los síntomas preferentemente en las primeras horas de la mañana, cuando la humedad relativa es alta (alrededor del 70 %). Las hojas inicialmente, desarrollan en los bordes manchas de apariencia húmeda, de color verde oscuro, de forma irregular, no delimitadas por las nervaduras de las hojas (Figura 1A). En condiciones de alta humedad se presenta esporulación y micelio del patógeno en el envés de los folíolos, aspecto que facilita el diagnóstico. Las lesiones se expanden rápidamente y se tornan de color café oscuro, posteriormente se necrosa el tejido, pudiendo avanzar la infección hasta los tallos (Figura 1B).

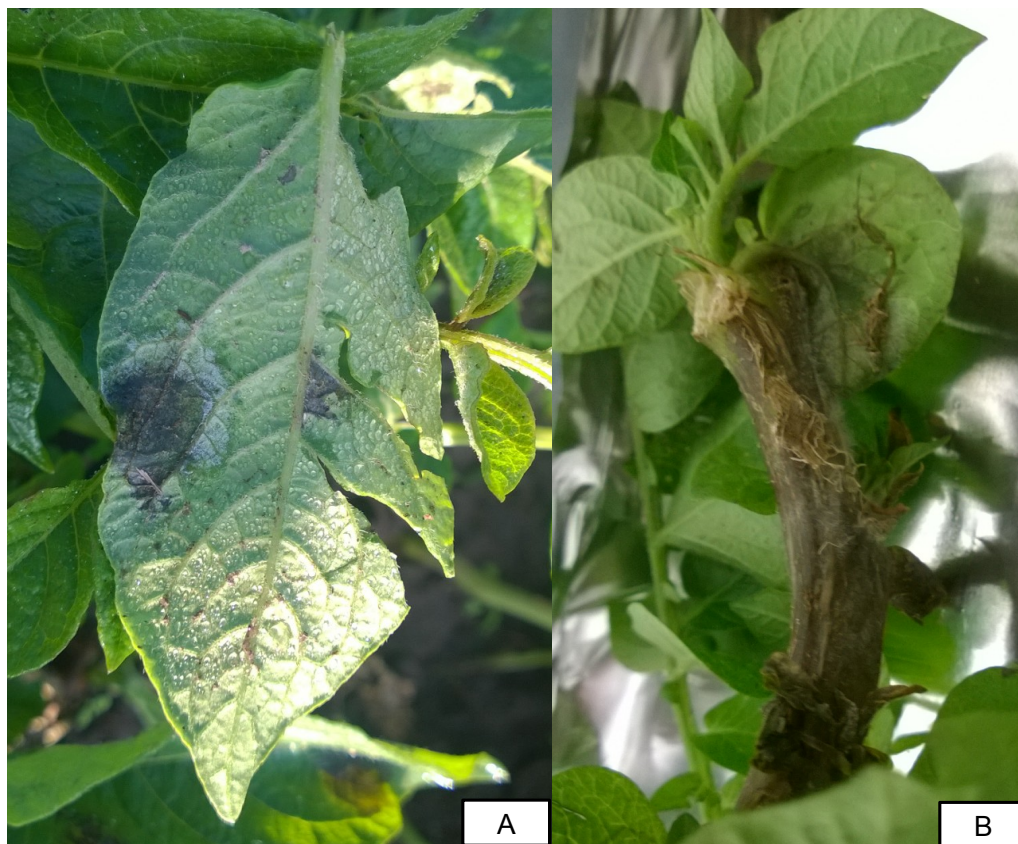


Figura 1. Síntoma de tizón tardío en papa en el Valle de Toluca. A) necrosis en el envés de hoja. B) lesión en tallo

Las lesiones que se deben coleccionar son las iniciales (presencia de menos de 30 % de necrosis en el área foliar), hojas con áreas necróticas mayor a 50 % dificultan el aislamiento del patógeno en el laboratorio por la incidencia de bacterias y otros organismos saprófitos. Se debe coleccionar las hojas que exclusivamente tengan síntomas de tizón tardío. Las hojas y/o tallos coleccionados deben llegar al laboratorio lo más pronto posible (no más de 3 días), las muestras deben estar libres de humedad externa al tejido vegetal y dentro de una bolsa plástica hermética. Las bolsas se transportan dentro de una hielera, la temperatura en el interior debe ser menor de 10 °C, para inhibir el desarrollo de patógenos u organismos saprófitos durante el transporte.

ACTIVIDADES EN EL LABORATORIO

Desinfestar el material vegetal: es conveniente procesar las muestras lo más pronto posible, en caso de no poder hacerlo se deben conservar en refrigeración en la misma bolsa donde se coleccionaron (no más de 2 días). Cuando las muestras vengan con tierra se lavan en agua de la llave, después en un lugar aséptico se desinfecta el material vegetal con cloro comercial (2 % de hipoclorito de sodio) por 3 min, se enjuaga con agua destilada dos veces, se asperja una solución de etanol al 80 % y se seca el exceso de humedad colocando las muestras sobre papel absorbente (10 min aproximadamente).

Esporulación en cámara húmeda: En un espacio de trabajo con condiciones asépticas (no necesariamente en cámara de flujo laminar), se colocan las muestras en cámara húmeda, de forma individual para cada foliolo y/o tallo o de manera conjunta dentro de una caja de mayor tamaño (Figura 3B). Para la caja grande, se utiliza papel aluminio para elaborar un contenedor rectangular que permite aislar físicamente del agua a los foliolos que se ubican con el envés hacia arriba, se coloca en la caja agua; se tapa bien, de manera que la humedad relativa se mantenga alta (más del 70 %) dentro de la caja (Figura 2). Pasadas las 24-36 horas de exposición en cámara húmeda, sobre el envés de los foliolos se desarrollará el micelio y las estructuras de reproducción asexual, los esporangios (Figura 3).

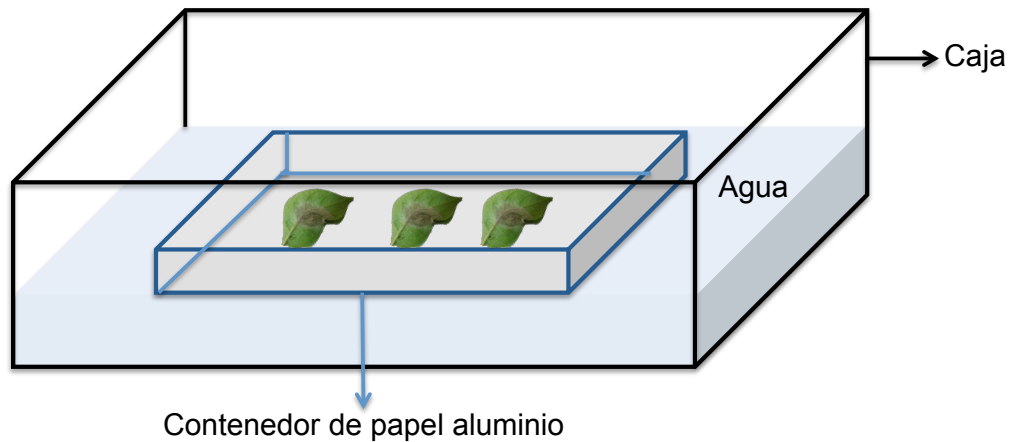


Figura 2. Esquema de cámara húmeda para el asilamiento de *P. infestans*

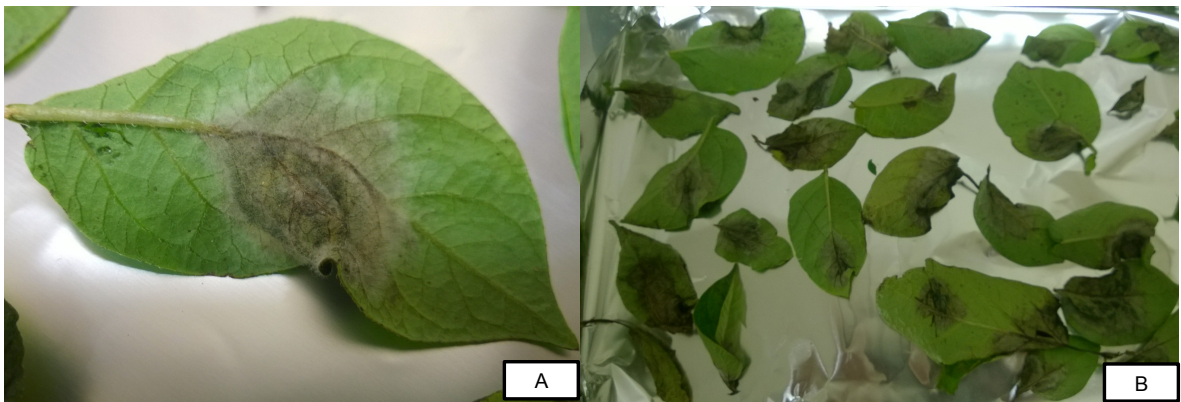


Figura 3. Esporulación en cámara húmeda entre 24 a 36 horas. A: esporulación en el envés de los folios y B: Varios foliolos en la cámara húmeda

Inoculación de rodaja de papa: Las rodajas de papa, actúan como filtro selectivo natural para *P. infestan*. Los tubérculos de preferencia debe ser de alguna variedad que no contenga demasiado almidón (var. Alpha). En un espacio de trabajo con condiciones asépticas (no necesariamente en cámara de flujo laminar), los tubérculos previamente se lavan con agua y jabón, se desinfestan con cloro comercial (2 % de hipoclorito de sodio) por 15 min, se enjuagan dos veces con agua destilada, se rocían con etanol al 80 % y se secan al aire libre (10 min aproximadamente). Sobre cada lesión con esporulación se coloca una rodaja de papa, de aproximadamente 5 mm de espesor (Figura 4B), la que se corta con un cuchillo o navaja flameada retirando el exceso de humedad con papel absorbente esterilizado. Las rodajas se

mantienen sobre los folíolos de papa de 24 a 36 horas (Figura 4A), pasado este tiempo se retira el tejido foliar dejando únicamente las rodajas (Figura 4B) para evitar que las bacterias del tejido foliar necrosado las contaminen. Las rodajas continúan en la misma cámara húmeda de 24-36 horas, o hasta que se vea sobre la superficie desarrollo de micelio (Figura 4C).

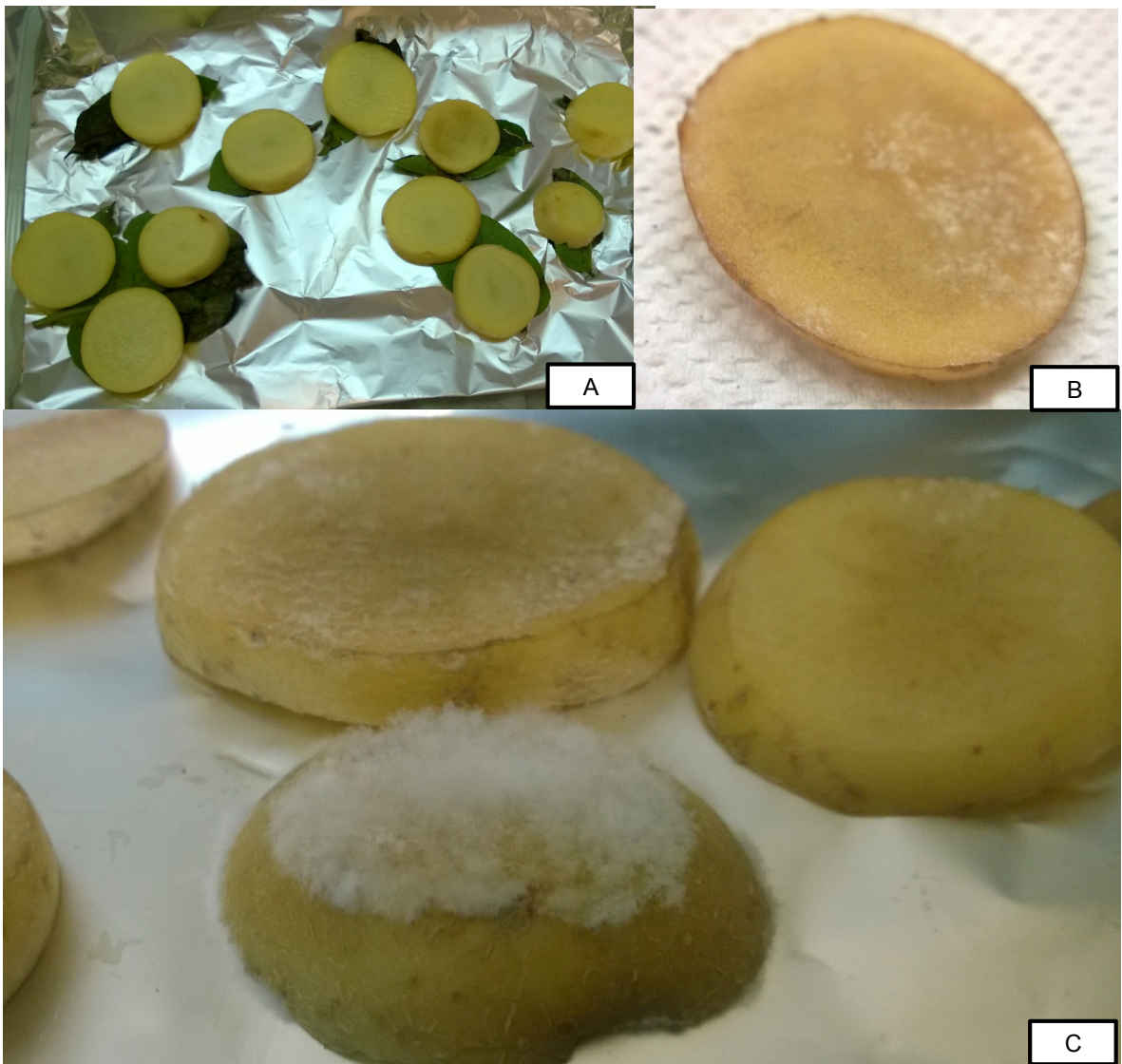


Figura 4. Inoculación de rodaja e papa. A: Rodaja de papa sobre folíolos con síntomas de tizón, B: Rodaja de papa sin el folíolo y C: crecimiento sobre rodaja de papa.

Transferencia a medio de cultivo selectivo de agar-centeno

En la cámara de flujo laminar, en condiciones asépticas se transfiere el micelio que crece sobre la rodaja de papa a medio de agar-centeno selectivo (Anexo 2). Con la ayuda de una aguja de disección recta o curva, se flamea al rojo vivo en el mechero de alcohol y se deja enfriar, se toma la parte aérea del micelio, sin tocar la superficie de papa y se transfiere a la caja de Petri que contiene medio de agar-centeno selectivo y/o no selectivo (Anexo 2), la diferencia radica en que en el medio selectivo el patógeno tardará en colonizar la caja de 20 a 30 días, mientras que en medio no selectivo se demorará aproximadamente 7-10 días. Una vez realizada la transferencia, se sellan las cajas con cinta Parafilm M ® y se incuban a temperaturas entre 16-20 °C.

ANEXO 2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR-CENTENO (RYE-A) (Basado en Grünwald et al., 2001)

Preparación de 1 L de concentrado de centeno: se pesan 600 g de centeno, se desinfectan con una solución de cloro comercial (2 % de hipoclorito de sodio) durante 10 minutos, las semillas se enjuagan con agua de la llave o destilada, se deja en reposo de 36 a 48 horas en 500 ml de agua destilada a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado el tiempo de reposo, se retira el exceso de agua, se licua el centeno hidratado con un litro de agua destilada, separando por porciones, no es necesario dejar completamente desintegrado el grano. La mezcla, se coloca en vasos de precipitado y se meten a la estufa a 55°C durante 2.5 horas o a 50 C por 3 h. Después, la mezcla de centeno se cuela a través de una manta y se afora el contenido a 1 L con agua destilada, el concentrado se deposita en botellas o frascos ámbar (este producto se debe utilizar antes de 3 días para evitar la pérdida de las propiedades, o se puede conservar en congelación en porciones de 100 ml durante 3 meses).

Preparación de 1 L de medio de cultivo agar-centeno (no selectivo): En una matraz se colocan 200 ml de agua destilada, se adiciona 23 g de glucosa, 15 g de agar bacteriológico y 100 ml del concentrado de centeno, mezclando después de adicionar cada elemento, se afora a 1 L con agua destilada y se esteriliza durante 15 minutos a 121 °C.

Preparación de medio selectivo de agar-centeno: A un litro de medio de agar-centeno, temperatura cercana a los 45 °C, se adiciona los siguientes antibióticos: 0.02 g Rifampicina, 0,05 g Polymixin B y 0.01 g Oxitetraciclina; y los fungicidas: 0.1 g Benomilo y 0.067 g PCNB (Pentacloro Nitrobenceno). Los antibióticos y fungicidas, deben agregarse en forma líquida, previamente se disuelven en DMSO (Dimetil Sulfóxido) o agua destilada estéril, es recomendable utilizar una solución stock. Por ejemplo, para la solución stock (10x) de antibióticos: 10 ml del solvente (DMSO o agua destilada estéril), 0.2 g Rifampicina, 0.5 g Polymixin B y 0.1 g Oxitetraciclina; y para la solución stock (10x) de fungicidas: 10 ml del solvente (DMSO o agua destilada estéril), 1 g

Benomilo y 0.670 g PCNB (Pentacloro Nitrobenceno). Una vez homogeneizadas las soluciones stock, se distribuyen por separado en tubos eppendorf (®) de 2ml, en cada tubo se coloca 1ml. Los tubos se pueden conservar a temperatura de -20 °C por 6 meses.

El vaciado o dispensación del medio de agar-centeno, debe realizarse en la cámara de flujo laminar; cuando el medio de cultivo, previamente esterilizado, disminuya la temperatura a aproximadamente 45 °C, se adicionan un tubo de antibióticos y uno de fungicidas en forma líquida (si están a -20 °C, aproximadamente de 30 a 40 min a temperatura ambiente estarán en forma líquida), con movimientos horizontales del contenedor del medio de cultivo se procura integrar y homogeneizar las soluciones al medio de cultivo. Para evitar la formación de gotas de agua por condensación en la tapa de las cajas de Petri, debe verterse en ellas 20-25 ml del medio de cultivo estéril y enfriado a una temperatura de 45°C al resguardo del mechero.

Almacenaje de las cajas con medio de agar-centeno: a temperatura ambiente 1- 2 semanas protegidos de la luz y hasta 3 meses a temperatura de 4 °C, guardando las cajas dentro de bolsas plásticas para evitar que se des sequen.