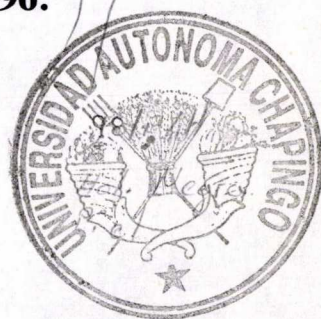


UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA AGRICOLA.

**GRUPO DE COMPATIBILIDAD, RAZA FISIOLÓGICA Y
SENSIBILIDAD AL metalaxyl DE AISLAMIENTOS MEXICANOS
DE *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary EN 1996.**



TESIS

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

DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCION VEGETAL**

PRESENTA:

JESUS HUMBERTO ARTEAGA GALLEGOS

Dx86796
-153075

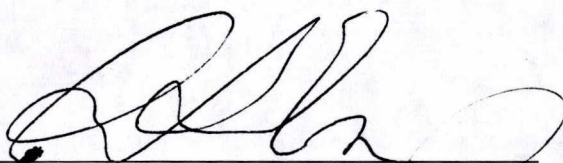
CHAPINGO, MEXICO. ABRIL DE 1997.



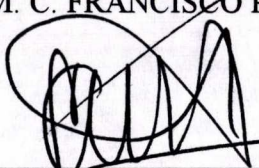
**GRUPO DE COMPATIBILIDAD, RAZA FISIOLÓGICA Y SENSIBILIDAD AL
metalaxyl DE AISLAMIENTOS MEXICANOS DE *Phytophthora infestans* (Mont.)
De Bary EN 1996.**

Tesis realizada por Jesús Humberto Arteaga Gallegos bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobado por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado
de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCION VEGETAL

DIRECTOR: 
~~DR. SEBASTIAN ROMERO COVA~~

ASESOR: 
M. C. FRANCISCO PONCE GONZALEZ

ASESOR: 
M. C. CECILIO MENDOZA ZAMORA

A. 3/2/15

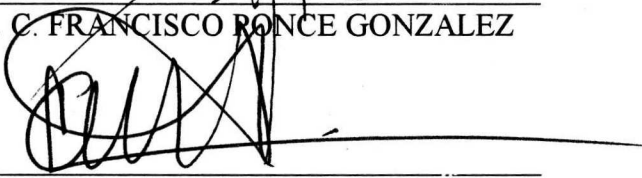
Chapingo, México. Abril de 1997.

**GRUPO DE COMPATIBILIDAD, RAZA FISIOLÓGICA Y SENSIBILIDAD AL
metalaxyl DE AISLAMIENTOS MEXICANOS DE *Phytophthora infestans* (Mont.)
De Bary EN 1996.**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Jesús Humberto Arteaga Gallegos autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

PRESIDENTE: 
DR. SEBASTIAN ROMERO COVA

ASESOR: 
M. C. FRANCISCO RONCE GONZALEZ

ASESOR: 
M. C. CECILIO MENDOZA ZAMORA

Chapingo, México. Abril de 1997.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Departamento de Parasitología Agrícola, por las facilidades para realizar mis estudios de Postgrado.

Al Dr. Sebastián Romero Cova por su dedicación, asesoría, y dirección del presente trabajo.

A los M. C. Francisco Ponce González y Cecilio Mendoza Zamora, gracias por su apoyo, por las sugerencias y asesoría brindada para la realización de este trabajo.

A los profesores de la Maestría en Protección Vegetal por sus valiosas enseñanzas.

A todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo, especialmente a los Ing. Alfonso Roberto Molina Pérez y J. Ramón Pérez Lugo y al Sr. Mario Salazar.

A MIS PADRES:

José María Arteaga Verduzco y María de Jesús Gallegos Galván.

A MIS HERMANOS.

CONTENIDO.

LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vi
 I.-INTRODUCCION.....	 1
 II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	 3
1.- La papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	3
1.1.- Importancia del cultivo.....	3
1.2.- Origen e historia.....	3
1.3.- Biosistemática.....	4
1.4.- Variedades.....	4
1.5.- Descripción botánica.....	5
1.6.- Requerimientos edafoclimáticos.....	5
1.7.- Enfermedades de la papa.....	6
2.- Tizón tardío.....	6
2.1.- Distribución e importancia económica.....	6
2.2.- Síntomas de la enfermedad.....	7
2.3.- Características morfológicas del agente causal, <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) De Bary.....	8
2.4.- Centro de origen del hongo.....	9
2.5.- Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i>	10
2.6.- Reproducción.....	12
2.7.- Grupos de compatibilidad.....	13
2.8.- Aparición del grupo de compatibilidad A2 fuera de México.....	14
2.9.- Ciclo de la enfermedad.....	16
2.10.- Epidemiología.....	18
2.11.- Variabilidad patogénica.....	20
2.11.1.- Concepto de raza fisiológica.....	22
2.11.2.- Origen de las razas fisiológicas.....	24
2.11.3.- Razas fisiológicas de <i>P. infestans</i> en México.....	25
2.11.4.- Razas fisiológicas de <i>P. infestans</i> fuera de México.....	26
2.11.5.- Herencia de la virulencia de <i>P. infestans</i>	27
2.11.6.- Prueba de virulencia.....	28
2.12.- Interacción hospedante-patógeno.....	30
2.12.1.- Histología y citología.....	30
2.12.2.- Bioquímica o molecular.....	31

3.- Sensibilidad de <i>Phytophthora infestans</i> a metalaxyl.....	32
3.1.- El fungicida metalaxyl.....	32
3.2.- Pruebas para determinar la sensibilidad.....	33
3.3.- Resistencia a metalaxyl.....	35
3.4.- Medida de la resistencia.....	37
III.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
1.- Colecta de material de papa infectado por <i>Phytophthora infestans</i>	39
2.- Obtención de los aislamientos.....	39
2.1.- Medios de cultivo.....	40
2.2.- Identificación de los aislamientos.....	41
2.3.- Identificación de los aislamientos.....	41
2.4.- Mantenimiento de los aislamientos.....	41
3.- Determinación de grupos de compatibilidad.....	42
4.- Determinación de razas fisiológicas.....	42
5.- Sensibilidad a metalaxyl <i>in vitro</i>	43
IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
V.- CONCLUSIONES.....	64
VI.- BIBLIOGRAFÍA.....	65

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1.- Países donde se ha reportado la presencia del grupo de compatibilidad A2 de <i>Phytophthora infestans</i> y el año en el cual se detectó por primera vez (Drenth <i>et al.</i> , 1993).....	15
Cuadro 2.- Relación entre genes de resistencia de papa y razas de <i>Phytophthora infestans</i> de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura (Black <i>et al.</i> , 1953).....	23
Cuadro 3.- Concentraciones de metalaxyl para calcular la CE ₅₀ del aislamiento 9603PN (A2) de <i>Phytophthora infestans</i>	45
Cuadro 4.- Concentraciones de metalaxyl para calcular la CE ₅₀ del aislamiento 9607PN (A1) de <i>Phytophthora infestans</i>	45
Cuadro 5.- Lugar de colecta, grupo de compatibilidad y raza fisiológica de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de papa colectados en 1996.....	49
Cuadro 6.- Grupos de compatibilidad de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de papa colectados en diferentes lugares en 1996.....	50
Cuadro 7.- Frecuencia relativa (<i>f</i>) de los genotipos de razas de 35 aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de México, 1996.....	52
Cuadro 8.- Incidencia de los genes de virulencia en aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de México, 1996.....	54
Cuadro 9.- Respuesta a metalaxyl y grupo de compatibilidad de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de México, 1996.....	57
Cuadro 10.- Respuesta de crecimiento <i>in vitro</i> del aislamiento 9607PN (A1) de <i>Phytophthora infestans</i> a metalaxyl.....	59
Cuadro 11.- Respuesta de crecimiento <i>in vitro</i> del aislamiento 9603PN (A2) de <i>Phytophthora infestans</i> a metalaxyl.....	60

Cuadro 12.- Concentraciones efectivas de metalaxyl y ecuaciones de regresión de las líneas dosis-probit para los aislamientos 9607PN (A1) y 9603PN (A2) de <i>Phytophthora infestans</i>	60
Cuadro 13.- Grupo de compatibilidad y respuesta a metalaxyl de aislamientos de <i>Phytophthora infestans</i> de México, 1996.....	62

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.- <i>Phytophthora infestans</i> . (A), esporangióforo ramificado en simpodio compuesto, con hinchamientos donde nacen los esporangios (Aumento:100x)	
(B), esporangios alimonados, con papila pequeña (Aumento:400x).....	51
Figura 2.- <i>Phytophthora infestans</i> . Oospora applerótica, con el anteridio anfigino (Aumento:400x).....	51
Figura 3.- <i>Phytophthora infestans</i> . Germinación de la oospora por medio de un tubo germinativo que termina en un esporangio (Aumento:100x).....	51

RESUMEN.

Con el propósito de determinar el grupo de compatibilidad, raza fisiológica y sensibilidad al metalaxyl se colectaron hojas y tallos de papa infectados por *Phytophthora infestans* en la Mesa Central de México en 1996. De este material se obtuvieron 37 aislamientos, los cuales fueron cultivados en medio de centeno-agar para producción de oosporas y en infusión de chícharo-agar para producción de esporangios. Del total de aislamientos, 20 (54%) fueron del grupo A1 y 17 (46%) del grupo A2, es decir, en proporción aproximada de 1:1. En general, los aislamientos de *P. infestans* fueron de raza compleja, pues de 35 aislamientos probados, se identificaron 19 razas con las diferenciales R1, R2, R3, R4, R6, R7, R10, R11, R1R2, R1R3, R2R3 y R2R4; la raza más común fue la 1.2.3.4.6.7, seguida por las razas 1.2.3.4 y 1.2.3.4.7; tal vez, si se hubiese contado con las diferenciales R5, R8 y R9, se hubieran identificado razas aún más complejas. De 36 aislamientos probados para sensibilidad a metalaxyl, 27, o sea, el 75% fueron resistentes y 9 sensibles. Todos los aislamientos del grupo de compatibilidad A1 (20) fueron resistentes.

SUMMARY.

To determine the compatibility group, physiological race and sensitivity to metalaxyl of Mexican isolates in 1996, leaves and stems of potato infected by *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary were collected in the Central plateau of Mexico. From this material 37 isolates were obtained, and grown on rye-agar culture medium for oospore production and on sweet pea infusion-agar for sporangial production. Twenty isolates (54%) reacted as A1 and 17 (46%) as A2, which means an approximate ratio of 1:1. With basis on the differential varieties R1, R2, R3, R4, R6, R7, R10, R11, R1R2, R1R3, R2R3 and R2R4; the 35 tested isolates showed to be complex races, the most common race was the 1.2.3.4.6.7, followed by the races 1.2.3.4 and 1.2.3.4.7; but it is possible that if the differentials with genes R5, R8 and R9 would had been available even more complex races might had appeared. Out of 36 isolates tested for sensitivity to metalaxyl, 27 were resistant and 9 sensitive; all the isolates of compatibility group A1 (20) were resistant.

I.- INTRODUCCIÓN.

El hongo *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary es el agente causal del tizón tardío de la papa, que es considerada como la enfermedad más importante de esta solanácea a nivel mundial (Thurston y Schultz, 1981; Steveson, 1993). Este oomiceto es heterotálico, con dos grupos de compatibilidad designados como A1 y A2, los cuales fueron descubiertos primero en Estados Unidos (Smoot *et al.*, 1958) y luego en México (Gallegly y Galindo, 1958). La interacción entre aislamientos de grupo de compatibilidad opuesto resulta en la formación de oosporas por recombinación sexual. En 1967, Romero y Erwin, obtuvieron un alto porcentaje de germinación de oosporas de *P. infestans*, logrando el establecimiento de cultivos mono-oospóricos y con la serie de diferenciales de Black *et al.* (1953) corroboraron que los genes de patogenicidad de este hongo se heredan independientemente; y de esta manera, pueden originarse nuevas razas fisiológicas por hibridación.

La variabilidad patogénica de *P. infestans* es la principal razón del fracaso de que los genes R específicos a una raza puedan proporcionar un control del tizón tardío satisfactorio y duradero. Aunque, estos genes, ahora están siendo abandonados en los programas de mejoramiento para resistencia a tizón tardío (Wastie, 1991), la información acerca de razas del patógeno es todavía esencial para los mejoradores, puesto que las pruebas de líneas con fines de mejoramiento con razas conocidas permanece como el único método para la identificación de genes R en el material vegetal y, eventualmente, descartar algunas líneas del programa de selección. Esto implica el conocimiento de la variabilidad patogénica del hongo, o sea, cómo éste va generando razas fisiológicas y va complicándose el trabajo de mejoramiento. Así, la gran cantidad de razas existentes en México y especialmente en el Valle de Toluca (Graham *et al.*, 1959; Rivera-Peña, 1990; Fernández, 1993) han hecho de este lugar un centro internacional para probar en una forma severa la resistencia de las progenies de papa resultantes en los programas de mejoramiento en otros países (Niederhauser, 1986).

En 1980, se detectaron los primeros aislamientos de *P. infestans* resistentes al fungicida sistémico metalaxyl en campos comerciales de papa en Irlanda (Dowley y O'Sullivan, 1981), Holanda (Davidse *et al.*, 1981) y Suiza (Staub y Sozzi, 1981), citados por Gisi y Cohen (1996). A partir de este año se han reportado fenotipos resistentes en varios países del mundo. En México, Matuszac *et al.* (1994) y Deahl *et al.* (1995) detectaron aislamientos sensibles e insensibles (resistentes) a metalaxyl en varios lugares. Este tipo de información es importante para desarrollar estrategias de manejo integrado del tizón tardío en papa.

Con base en los aspectos anteriores, se planteó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar el grupo de compatibilidad de aislamientos de *P. infestans* obtenidos de material colectado en los estados de México y Tlaxcala, en 1996.
- 2.- Determinar la raza fisiológica de los aislamientos de *P. infestans* obtenidos.
- 3.- Investigar la respuesta de aislamientos de *P. infestans* a metalaxyl y su relación con el grupo de compatibilidad.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA.

1.- LA PAPA (*Solanum tuberosum* L.).

1.1.- Importancia del cultivo.

En México, al igual que en varios países del mundo, el cultivo de papa está considerado como de los más importantes en el contexto de la producción de alimentos, siendo superado únicamente por el maíz, frijol, trigo y arroz. Actualmente, en nuestro país se siembran alrededor de 80,000 hectáreas, las cuales permiten satisfacer los requerimientos de consumo nacional. Esta superficie comprende una primera región, que son los valles que cuentan con riego o poseen un temporal estable y donde se practica una agricultura altamente tecnificada, la cual abarca alrededor de 18,000 ha del total. Una segunda región la constituyen las sierras o valles altos que se cultivan bajo condiciones de temporal y donde se practica una agricultura de subsistencia que comprende 52,000 ha. La papa se produce en los ciclos de otoño-invierno y primavera-verano, siendo el más importante este último, que aporta 59% de la producción. El cultivo bajo condiciones de temporal comprende el 51% de la superficie total cultivada y el restante bajo riego (Anónimo, 1994).

Las principales regiones productoras de papa en México, se localizan en lugares con altitudes que van desde los 15 msnm como en algunas zonas de Baja California Norte, Sonora y Sinaloa, hasta los 3000msnm en sierras y valles altos de los estados de México, Michoacán, Guanajuato, Puebla, Hidalgo y Tlaxcala. En el Edo. de México, los principales municipios productores de papa son: Temascaltepec, Valle de Bravo y Amanalco, cuya producción se realiza en el ciclo otoño-invierno; San Felipe del Progreso, Zinacantepec, Tenango del Valle, con la producción en el ciclo primavera-verano (Anónimo, 1994).

1.2.- Origen e historia.

El centro de origen de la papa cultivada se ubica en la cordillera de los Andes de sudamérica, al sur de Perú y norte de Bolivia (Hawkes, 1994).

La historia europea de la papa inicia con la introducción de la forma tetraploide *andigena* a Europa en 1570 a través del puerto de Sevilla, donde se cree que fue cultivada

por algunos años. De España se fue extendiendo a otros países como Italia e Inglaterra pero como curiosidad botánica, no como alimento. Hacia 1590 se cita la entrada de la papa a Irlanda procedente de América. De España fue llevada a América del Norte en 1691 vía las Islas Bermudas (Hooker, 1981; Wastie, 1991; Hawkes, 1994; Alonso, 1996).

1.3.- Biosistemática.

Las papas cultivadas, constituídas por un número de especies o híbridos, pertenecen a la familia Solanaceae, sección Tuberarium y al género *Solanum* (su complemento básico cromosómico es $x=12$). Este género, comprende más de 2000 especies de las cuales 8 son cultivadas y 160-180 producen tubérculos (Wastie, 1991; Rowe, 1993).

La mayoría de las papas cultivadas comercialmente pertenecen a la especie *S. tuberosum* que es un tetraploide ($2n=4x=48$ cromosomas), compuesta por las subespecies *tuberosum* y *andigena*, las cuales son completamente fértiles entre sí. Así, muchas de las variedades modernas son híbridos entre estas dos subespecies y otras especies como *S. demissum*. La subsp. *andigena* es la más ampliamente cultivada en Sudamérica; tiene ojos profundos y produce tubérculos bajo condiciones de días cortos, mientras que la subsp. *tuberosum* que es cultivada en el norte de Europa y América del Norte tiende a requerimientos de días largos para su efectiva tuberización (Hooker, 1981; Alonso, 1996).

1.4.- Variedades.

A nivel mundial se cuenta con más de un millar de variedades. En México, las variedades cultivadas son: Alpha, Atzimba, Juanita, Rosita, Anita, López, Furore, Atlantic, Tollocan, Leona, Puebla, Montsama, Michoacán, Mexiquense, Norteña, Rojita, Diamante y otros clones (Valadez, 1996).

Las variedades mexicanas Atzimba, López, Yema, Leona, Tollocan, Rosita y Juanita, entre otras, son el resultado de cruas entre *S. tuberosum* y *S. demissum* que se liberaron como resistentes al tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Anónimo, 1994).

1.5.- Descripción botánica.

La papa es una planta dicotiledonea anual, potencialmente perenne debido a su capacidad de reproducción por tubérculos; crecen hasta una altura de 30 a 100 cm; presentan tallos angulares, generalmente verdes; las hojas maduras son compuestas y consisten de un peciolo con un foliolo terminal, foliolos laterales secundarios y, a veces, foliolos laterales terciarios; son pinnadas y con disposición alterna; después de desarrollar de 6 a 9 hojas, pueden aparecer brotes florales en todas o algunas de las ramas apicales; las flores son pentámeras, de colores diversos variando desde el blanco al morado; el fruto maduro es de forma redonda u oval, de 1 a 3cm de diámetro, de color verde a amarillo, consta de dos lóculos en los cuales se alojan las semillas (200 a 300). Las raíces y estolones se desarrollan a partir del tallo subterráneo, entre el tubérculo semilla y la superficie del suelo. Los tubérculos se pueden considerar como la parte del tallo que se ha adaptado para almacenar reservas y para la reproducción. El tubérculo se forma en el extremo del estolón como consecuencia de la proliferación del tejido de reserva (parénquima) que resulta de un rápido desarrollo y división celular. De los ojos de los tubérculos es de donde surgen los brotes que darán lugar a la nueva planta; el brote dominante da lugar al tallo principal (Hooker, 1981; Beukema y Van der Zaag, 1990).

1.6.- Requerimientos edafoclimáticos.

La papa es una planta semiresistente al frío, pero no tolera heladas. La temperatura óptima ambiental para obtener los máximos rendimientos oscila entre 15 y 18°C. La temperatura óptima del suelo para la emergencia es de 22°C; temperaturas de 16°C por la noche y mayores de 18°C por el día arrojan los rendimientos más altos. El fotoperíodo y la temperatura afectan la formación del tubérculo; en días largos la formación de estos ocurre si la temperatura nocturna es inferior a 20°C, óptima de 12°C (Valadez, 1996).

La papa se desarrolla bien en suelos francos y arenosos, con buen contenido de materia orgánica, óptimo drenaje, con pH de 5.0 a 6.5. En lo referente a nutrientes, la planta demanda nitrógeno (70-200 Kg/ha), fosfatos (225-280 Kg/ha), potasio (170-280 Kg/ha) y magnesio, principalmente.

1.7.- Enfermedades de la papa.

La papa es susceptible a varias enfermedades, las cuales son causadas por hongos, bacterias, virus, viroides y micoplasmas; que pueden atacar al follaje, raíz y tubérculos.

En los Estados Unidos se han identificado 50 especies de hongos, 10 especies de bacterias y más de 30 virus y micoplasmas causando daños (Rich, 1991, citado por Oerke, 1994).

Los virus más importantes en papa son: virus del enrollamiento de la hoja (PLRV), virus Y (PVY) y el virus A (PVA), según Oerke (1994).

Las principales bacterias patógenas que atacan a la papa son: *Erwinia carotovora* (Pudrición suave), *Pseudomonas solanacearum* (Marchitez bacteriana), *Clavibacter michiganense* patovar *sepedonicum* (Necrosis bacteriana) y *Streptomyces scabies* (Sarna o roña común).

A nivel mundial, las principales enfermedades fungosas son causadas por: *Phytophthora infestans* (Tizón tardío), *Alternaria solani* (Tizón temprano), *Rhizoctonia solani* (Costra negra) y *Synchytrium endobioticum* (Sarna o roña). De menor importancia son: *Fusarium* ssp. (Marchitez), *Phoma exigua* (Gangrena) y *Spongospora subterranea* (Sarna o roña polvorienta), entre otras (Oerke, 1994).

2.- TIZÓN TARDÍO.

2.1.- Distribución e importancia económica.

El tizón tardío de la papa y el tomate, es la enfermedad más importante de la papa en el mundo (Thurston y Schultz, 1981) y se ha incrementado como resultado de la expansión de la superficie cultivada en regiones con clima cálido, donde en la forma de tizón foliar tardío, es frecuentemente el principal factor limitante de la producción (Oerke, 1994).

La distribución del tizón tardío es mundial y coincide con la distribución de las áreas geográficas donde se cultiva la papa. La enfermedad es más fácil encontrarla en áreas productoras de papa con clima frío y húmedo durante la estación de crecimiento, como en la mayoría de las áreas de Europa, el Reino Unido, noroeste de América del Norte, México,

vertiente oeste de la cadena montañosa sobre los países del Océano Pacífico, América Central, África, Oceanía y Australia (Platt, 1992).

El impacto de la enfermedad presenta aspectos económicos y sociales, aunque éstos fueron más dramáticos durante la década de 1840, principalmente en Irlanda, donde causó hambruna y emigración de sus habitantes. Por otra parte, la importancia del impacto del tizón tardío sobre la industria papera mundial es debida a la significancia del cultivo en las economías local, nacional e internacional y en el suministro de alimentos (Horton y Fano, 1985, citado por Platt, 1992).

El impacto de la enfermedad puede ser dividido en dos componentes aditivos, pérdidas directas por la enfermedad y los costos de su prevención. Así, reduce el rendimiento, la calidad, tamaño y cantidad de materia seca del tubérculo y la rentabilidad del cultivo. Large (1952), citado por Jellis y Boulton (1984), indica que el desarrollo del tubérculo se detiene cuando el 75% del follaje es destruido por el tizón tardío. Bajo condiciones de una epidemia no controlada, las pérdidas pueden llegar al 100%, particularmente cuando la infección del tubérculo es extensa y ocurre el subsecuente deterioro en el almacén (Rovertson, 1991; Platt, 1992; Steveson, 1993).

Oerke (1994) menciona que las pérdidas en cultivo de papa a nivel mundial son: por enfermedades (16.3%), por plagas (16.1%) y por malezas (8.9%), dando un promedio de 41.3%. Las pérdidas debidas a enfermedades, particularmente, al ataque por *P. infestans* son las más altas, de 20 a 27% en las regiones tropicales de África, Asia y América del Sur; en América del Norte y Europa del Oeste son de 10 a 13%.

2.2.- Síntomas de la enfermedad.

El hongo ataca hojas, tallos y tubérculos. A menudo la enfermedad aparece al final de la estación de crecimiento después de la floración; sin embargo, en algunas áreas tales como los valles de México, los síntomas pueden observarse sólo unas pocas semanas después de la siembra. La enfermedad generalmente se presenta primero sobre las hojas más bajas, aunque bajo condiciones de alta humedad, los síntomas pueden ser vistos inicialmente sobre las hojas superiores de la planta (Platt, 1992).

En las hojas, los síntomas en un principio tienen la apariencia de manchas circulares, que rápidamente toman un color café o café purpúreo, rodeadas por un halo de color verde amarillento y por lo común aparecen en los bordes de las hojas inferiores; si el tiempo es húmedo y fresco pueden crecer rápidamente, coalescer y cubrir toda la hoja. Por el envés, las manchas se cubren de un vello blanquecino compuesto por las fructificaciones del hongo, esporangióforos y esporangios. De las hojas, la infección avanza hacia el pecíolo y luego al tallo, el cual muestra manchas alargadas del mismo color que el de las hojas. El tallo toma una consistencia vítrea y se quiebra con poco esfuerzo. En condiciones prolongadas de humedad, todos los órganos aéreos de las plantas se marchitan y pudren con gran rapidez, desprendiéndose un aroma característico (Romero, 1988; Agrios, 1995).

Los tubérculos que han sido infectados muestran en un principio manchas más o menos irregulares y de un color parduzco o entre negro y púrpura. Cuando se cortan, el tejido afectado tiene apariencia húmeda, un color oscuro o un tanto pardo rojizo y se extiende de 5 a 15mm en la pulpa del tubérculo. Más tarde, las zonas afectadas adquieren cierta firmeza, se secan y se reabsorben en un cierto grado; la pudrición continúa desarrollándose después de que los tubérculos han sido cosechados, o bien los tubérculos infectados pueden ser invadidos posteriormente por hongos y bacterias que provocan una completa descomposición del tubérculo (Thurston y Schultz, 1981; Agrios, 1995).

2.3.- Características morfológicas del agente causal, *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary.

El primero en ocuparse de la taxonomía de *P. infestans* fue Martius (1842), quien le dió el nombre de *Gangrena tuberum solani*; en 1845, Montagne la clasificó como *Botrytis infestans*; Unger, en 1847, la cambió al género *Peronospora*, hasta que finalmente, De Bary, en 1876, propuso el género *Phytophthora*, sugiriendo a esta especie como tipo, con las siguientes características: **micelio** liso, poco ramificado, de 4.2 a 13.5 μ de diámetro, promedio de 9.2 μ ; **esporangióforos** abundantes en avena-agar, frijol lima-agar, jugo de verduras-agar, jugo de tomate-agar y en agua destilada, ramificados en simpodio compuesto, con hinchamientos en las ramas donde nacen los esporangios, de crecimiento indeterminado; **esporangios** ovales a elípticos, alimonados, con papila inconspicua,

deciduos, de 21 a 38 x 12 a 23 μ , promedio 29 x 19 μ . **Gametangios:** el oogonio es liso, globoso y activo, de 38 a 50 μ , promedio de 40 μ , el anteridio es anfigino y pasivo, **oosporas** lisas, de paredes gruesas, esféricas, apleróticas, de 25 a 35 μ de diámetro, promedio de 30 μ (Romero, 1988).

Cabe señalar que la descripción de *P. infestans* fue hecha considerando únicamente sus estructuras asexuales (micelio, esporangióforos y esporangios), pues a pesar del examen minucioso que de hojas, tallos y tubérculos llevo a cabo De Bary, jamás encontró oosporas (Romero, 1988).

2.4.- Centro de origen del hongo.

P. infestans, apareció casi simultáneamente en Europa en 1845 y en Norteamérica en 1843, casi 300 años después de que la papa cultivada se introdujo a Europa de Sudamérica. Bourke (1964) es autor de una revisión bien detallada y documentada de la aparición y diseminación de esta enfermedad y su patógeno en Europa. Subsecuentemente, *P. infestans* se ha presentado en todas las áreas donde se cultiva la papa (Cox y Large, 1960).

Desde el descubrimiento de que el grupo de compatibilidad A2 es común en la Mesa Central de México o Valles Altos (Smoot *et al.*, 1958; Niederhauser, 1956; Gallegly y Galindo, 1958) se han acumulado evidencias de que este lugar representa o es el centro de origen de *P. infestans* (Niederhauser, 1986 y 1991). Varias líneas de evidencia apoyan esta hipótesis: 1), esta región ha sido históricamente la única en la cual ocurren los dos grupos de compatibilidad (A1 y A2) en igual proporción (Gallegly y Galindo, 1958); 2), la población de *P. infestans* en esta región, particularmente en el Valle de Toluca, es especialmente diversa para características de virulencia que aislamientos de poblaciones con reproducción asexual (Mills y Niederhauser, 1953; Tooley *et al.*, 1986); así como para otras características como: tipos de crecimiento sobre medios de cultivo, tolerancia a sustancias químicas y homotalismo, tal variabilidad en una población es típica de una especie biológica en su habitat natural; y 3), las poblaciones de *P. infestans* en la Mesa Central de México son marcadamente diversas para marcadores neutrales. Esta, es la única localidad en la cual se han detectado todos los alelos de alozimas conocidos, así como todas las bandas reveladas por los perfiles de hibridación de ADN conocidas (Goodwin *et al.*, 1992).

Otras líneas de evidencia son consistentes con la idea de que la población en el Valle de Toluca se reproduce sexualmente, mientras que las poblaciones de cualquier otra parte lo hacen asexualmente. La distribución de los genotipos con el alelo *Gpi* (isomerasa glucofosfato) fueron consistentes con la ley de equilibrio Hardy-Weinberg en poblaciones del Valle de Toluca, pero en otras poblaciones no, lo cual sugiere que ocurre el apareamiento al azar en la población mexicana de *P. infestans* (Tooley *et al.*, 1985; Fry *et al.*, 1993).

De acuerdo con la teoría de Vavilov (1935), la existencia en un lugar de una población de plantas silvestres a un patógeno, sugiere que tal región es el lugar de origen del patógeno; así, la Mesa Central de México sería el lugar de origen más probable de este patógeno. Gracias a los trabajos de Black, Reddick, Mastenbroek y otros, se ha propuesto un sistema gene por gene para *P. infestans* y las especies de papa silvestres en México, ya que para cada nuevo gene de resistencia en una especie de papa silvestre se encontró su contraparte en el germoplasma del patógeno. A la fecha, se han identificado más de 15 genes de resistencia dominantes (principalmente de *S. demissum*, con unos pocos de otras especies silvestres como *S. stoloniferum*) y cada gene R tiene su contraparte en virulencia en *P. infestans*. El hecho de que todos los genes R se encuentren en las papas silvestres únicamente en la Mesa Central de México junto con todas sus contrapartes de virulencia, es una evidencia adicional de que ésta es la región de origen del patógeno, así como de las especies de papa resistentes (Niederhaurser, 1991).

2.5.- Aislamiento y cultivo *in vitro*.

Las especies del género *Phytophthora* son uno de los grupos de hongos fitopatógenos más difíciles de aislar (Tsao, 1970), y esto se aplica aún más para *P. infestans*. Mientras que éste puede ser fácilmente aislado de tejidos con infecciones frescas por una persona con experiencia, el aislamiento en medio sólido puede ser difícil y tedioso, ya que este hongo crece lentamente y es fácilmente invadido por otros hongos y bacterias. Para contrarrestar este problema, se usan medios selectivos enmendados con antibióticos, como el medio 3P (pimaricina, penicilina y polimixina), el cual fue primeramente reportado por Eckert y Tsao (1960 y 1962) para el aislamiento de *Phytophthora* ssp. de raíces de plantas.

La concentración de estos antibióticos es variable, la más usada es la de 100ppm de cada uno. La pimaricina inhibe el crecimiento de casi todos los hongos del suelo, excepto un pequeño grupo que incluye a miembros de la familia Pythiaceae, donde se encuentra *P. infestans*. La penicilina y la polimixina son agentes antibacteriales; aunque éstos pueden ser reemplazados por la vancomicina (Tsao, 1970). Otros antibióticos y fungicidas de uso actual en los aislamientos son: nistatina, rifampicina, ampicilina, PCNB y benomyl.

El hongo *P. infestans* necesita tiamina y nitrógeno en forma reducida para su crecimiento. Este crece mejor sobre una fuente de carbono simple como glucosa o sacarosa. Sin embargo, sus requerimientos nutricionales pueden variar considerablemente (Holh, 1983). Las cepas más simples crecen en un medio de glucosa-amonio, mientras que los aislamientos más exigentes tienen requerimientos más específicos para aminoácidos. Los esteroides (β -sitosterol) y otros lípidos, en particular ácidos grasos insaturados, influyen positivamente sobre el crecimiento. Ocasionalmente, se requieren otros factores de crecimiento, tales como la base purina. Aún más, otros aislamientos no crecen substancialmente en cualquier medio líquido y parecen acercarse al estatus de parásitos obligados (Holh, 1991).

Como se mencionó anteriormente, no ha sido fácil cultivar a *P. infestans* en medio artificial. El hongo se ha cultivado con más o menos éxito, en materiales vegetales cocidos, especialmente vainas y semillas de legumbres (chicharo, frijol lima, garbanzo) y cereales (avena, centeno, maíz). Entre los medios seminaturales más comúnmente usados hoy día son aquellos basados en centeno (Caten y Jinks, 1968; Deahl *et al.*, 1993 y 1995), jugo V-8 enmendado con CaCO_3 , y chicharo-agar (Andrison *et al.*, 1994). Estos medios se usan tanto para el aislamiento y crecimiento inicial como para pruebas de apareamiento, ya que favorecen un rápido crecimiento y esporulación abundante.

En la mayoría de medios de cultivo las colonias muestran un desarrollo uniforme de hifas aéreas, la mayoría de las cuales funcionan como esporangióforos; mientras que otras colonias presentan agregados irregulares de hifas aéreas, las cuales son estériles, pero las hifas se ramifican intensa y dicotómicamente, dando colonias de una apariencia moteada o terronuda. Este tipo de fenotipo lo encontraron Shattock *et al.* (1990) sólo en aislamientos A2, particularmente sobre centeno-agar, en comparación a jugo V8 o chicharo-agar.

Además, observaron que algunos aislamientos de ambos grupos de compatibilidad fueron incapaces de crecer en V8-agar. Resultados similares encontraron Sato y Kato, citado por Shaw (1991), donde los aislamientos del grupo de compatibilidad A2, los cuales predominan en Japón, son débiles para crecer en V8; en contrasre, los aislamientos del grupo A1 crecieron bien en V8, pero fueron incapaces para colonizar medio de harina de avena-agar, el cual mantiene un buen crecimiento de aislamientos A2. Esta incapacidad para crecer sobre estos medios puede deberse a sensibilidad a inhibidores o a la ausencia de un nutriente requerido por aislamientos débiles.

2.6.- Reproducción.

El hongo *P. infestans* es un oomiceto que se reproduce asexual y sexualmente. La primera, ocurre en todos los lugares donde se ha observado al hongo en la naturaleza. La peproducción sexual ocurre más raramente debido a la ocurrencia limitada de los dos grupos de compatibilidad.

La reproducción asexual primero involucra la formación de esporangióforos, los que a su vez producen esporangios. Los esporangios germinan a temperaturas desde 1.5 a 24°C, ya sea directamente al producir un tubo germinativo o indirectamente, por medio de zoosporas. A temperaturas de 12 a 15°C dentro de cada esporangio se forman de 3 a 8 zoosporas biciliadas, las cuales son liberadas cuando se rompe la pared esporangial a nivel de su papila, nadan libremente en agua por algún tiempo y luego se enquistan, los quistes al germinar emiten un tubo germinativo, el cual puede penetrar a la hoja o al tallo por los estomas. Por arriba de los 15°C, los esporangios germinan directamente produciendo un tubo germinativo. Los tubos germinativos pueden penetrar a la planta a través de los estomas, aunque generalmente forman un apresorio, de tal manera que la hifa de penetración ingresa directamente a través de la cutícula. Una vez dentro de la planta, el micelio se desarrolla intra e intercelularmente proyectando haustorios dentro de las células para alimentarse (Agrios, 1995; Platt, 1990).

En la reproducción sexual del hongo están involucrados dos grupos de compatibilidad, A1 y A2. Cuando las hifas de grupos de compatibilidad opuesto hacen contacto, se formán anteridios y oogonios. El oogonio crece a través del anteridio y luego se

expande rápidamente debido al flujo de citoplasma a través de la base oogonial. Después de la fertilización se desarrolla una oospora de pared gruesa. La germinación de las oosporas involucra el consumo de los cuerpos lípidos en el ooplasto, disolución de la pared oospórica y la formación de un tubo germinativo, el cual produce micelio o un esporangio; éste puede germinar directamente o producir zoosporas (Drenth *et al.*, 1993).

2.7.- Grupos de compatibilidad.

El estado sexual de *P. infestans* permaneció como un misterio por más de medio siglo. Varios investigadores reportaron el hallazgo de oosporas de *P. infestans* en Europa y en los Estados Unidos, algunas veces en tubérculos u hojas de papa infectadas, así como en cultivos puros del hongo en medio de cultivo (Clinton, 1911; Pethybridge y Murphy, 1913; Lohnis, 1922; de Bruyn, 1923; Ericksson, 1923). Sin embargo, nunca se dió una explicación adecuada para estas apariciones esporádicas del estado sexual y a menudo las observaciones reportadas no pudieron ser repetidas experimentalmente (Niederhauser, 1991). Esto trajo como consecuencia la sospecha de que *P. infestans* fuera mas bien un hongo heterotálico que necesitaba la participación de dos talos diferentes para su reproducción sexual.

Por este motivo se inició una serie de investigaciones que consistieron en cruzamientos interespecíficos, pero no fué sino hasta 1956 cuando en Estados Unidos se obtuvieron los primeros resultados positivos. Del trabajo realizado en la Universidad de Virginia del Oeste en Estados Unidos, se concluyó que *P. infestans* es una especie heterotálica. Smoot *et al.* (1958) reunieron 109 aislamientos de varios países de Europa, Sudáfrica, Estados Unidos, Canada, las Islas Occidentales y México, e hicieron apareamientos en todas las combinaciones posibles y encontraron que: tres aislamientos de México formaron oosporas en abundancia con todos los aislamientos extranjeros pero no con uno de México, lo cual permitía concluir que *P. infestans* es heterotálico y que sólo en México existían los dos grupos de compatibilidad (A1 y A2). Resultados similares reportaron Gallegly y Galindo en ese mismo año, en México. De 95 aislamientos procedentes de Toluca, Chapingo y lugares circunvecinos: 52 (55%) reaccionaron como del grupo A1 y los restantes 43 (45%) reaccionaron como A2, o sea, aproximadamente en la proporción de 1:1. Además, en hojas de la variedad Kathadin con infección natural, también

encontraron oosporas. Arbitariamente, los aislamientos que se aparearon con el aislamiento 43M y no formaron oosporas se colocaron en el grupo A1, mientras que aquellos que se aparearon con aislamientos extranjeros y formaron oosporas se colocaron en el grupo A2.

Para conocer la reacción de compatibilidad de un aislamiento desconocido, éste se coloca en el centro de una caja Petri y a cada lado los aislamientos de compatibilidad conocida. La producción de oosporas tiene lugar solo con uno de estos aislamientos después de que se mezcla el micelio de las dos colonias.

El crecimiento de los grupos de compatibilidad A1 y A2 en un medio de cultivo con el propósito de producir oosporas y de establecer la progenie de una sola oospora, se conoce como un apareamiento o una cruce (Shaw, 1991).

2.8.- Aparición del grupo de compatibilidad A2 fuera de México.

Fuera de la Mesa Central de México no se habían detectado aislamientos del grupo de compatibilidad A2, por lo que *P. infestans* se reproducía en forma asexual únicamente. Sin embargo, en los primeros años de la década de 1980, se descubrieron aislamientos del grupo A2 en Suiza (Hohl e Iselin, 1984) y, posteriormente, en muchos otros países, de todos los continentes, excepto la Antártida y Australia (Drenth *et al.*, 1993; Fry *et al.*, 1993), tal como se observa en el Cuadro 1.

En México, ambos grupos de compatibilidad se encontraron en una proporción de 1:1 (Gallegly y Galindo, 1958). En Europa el grupo A1 aparece como el más común. Para Alemania y Holanda, el número de aislamientos A2 fluctúa entre 15 y 50% de las muestras probadas. Para aislamientos de Japón la proporción A1:A2 se estimó ser de 1:9 (Schöber y Turkensteen, 1992).

A partir del descubrimiento de aislamientos del grupo de compatibilidad A2 en Europa, se han presentado varias hipótesis para explicar su aparición. Una hipótesis establece que el grupo A2 se originó del grupo A1 ya sea por mutación o recombinación mitótica (Schattock *et al.*, 1990).

La segunda hipótesis establece que aislamientos del grupo A2 estuvieron presentes antes de 1980, pero a una frecuencia tan baja que nunca se detectaron (Shaw, 1987). Un incremento en la frecuencia de ciertos genotipos puede ocurrir cuando la aptitud relativa de

esos genotipos cambia debido, por ejemplo, a una mutación o a un cambio en el ambiente. Un cambio significativo en el ambiente para *P. infestans* pudo haber sido la introducción del fungicida metalaxyl en 1979 (Davidse *et al.*, 1981, citado por Drenth, *et al.*, 1993).

Cuadro 1. Países donde se ha reportado la presencia del grupo de compatibilidad A2 de *Phytophthora infestans* y el año en el cual se detectó por primera vez (Drenth *et al.*, 1993).

PAIS	AÑO	REFERENCIA
México	1956	Niederhauser (1956). Tr. N. York Acad. Sci. 19:55-63
Alemania del Este	1980	Dagget <i>et al.</i> (1993). Phytopathology 83: 319-323.
Suiza	1981	Hohl & Iselin (1984). Tr. Br. Mycol. Soc. 83: 529-530.
Inglaterra/Gales	1981	Tantius <i>et al.</i> (1986). Plant Pathology 35: 578-571.
Holanda	1981	Frinking <i>et al.</i> (1987). Neth. J. Pl. Pathol. 93: 147-149.
Escocia	1983	Malcolmson (1985). Tr. Br. Mycol. Soc. 85: 531.
Israel	1983	Grinberger <i>et al.</i> (1989). Phytoparasitica 17: 197-204.
Egipto	1984	Shaw <i>et al.</i> (1985). Plant Pathology 34: 552-556.
Suecia	1985	Kadir & Umaerus (1987). Ab. 10th EAPR conf. DK p. 223.
URSS	1985	Vorob'eva <i>et al.</i> (1991). Mikolog. y Fitopatol. 1: 62-67.
Japón	1985	Mosa <i>et al.</i> (1989). An. Phytopath. Soc. Jap. 55: 615-620.
Alemania del Oeste	1985	Schober & Rullich (1986). Potato Research 29: 395-398.
Brasil	1986	Brommonschenkel (1988). M. Sc. Thesis Vicosa, Brasil.
Estados Unidos	1987	Deahl <i>et al.</i> (1991). Amer. Potato Journal 68: 717-726.
Polonia	1988	Spielman <i>et al.</i> (1991). Plant Pathology 40: 422-430.
Irlanda	1988	O'Sullivan & Dowley (1991). Irish. J. Agr. Res. 30: 67-69.
Canada	1989	Deahl <i>et al.</i> (1991). Amer. Potato Journal 68: 717-726.
Ecuador	1989	Fry <i>et al.</i> (1993). Plant Disease 77: 653-661.
Colombia	1990	Fry <i>et al.</i> (1993). Plant Disease 77: 653-661.
Bolivia	1990	S. B. Goodwin, no publicado.
Korea	1991	Y. J. Koh, no publicado.
China	?	Fry <i>et al.</i> (1993). Plant Disease 77: 653-661.

La tercera hipótesis explica la presencia de aislamientos del grupo A2 a través de su introducción reciente desde la Mesa Central de México. Con la aparición del grupo A2 se incrementó significativamente la diversidad de factores de virulencia. La diversidad de virulencia en aislamientos europeos es ahora similar a la que se presenta en la Mesa Central de México, donde ocurren muchas razas diferentes y complejas de *P. infestans* (Rivera - Peña, 1990). Los aislamientos europeos colectados antes de 1980 difieren en los alelos de alozimas (enzimas que difieren en la movilidad electroforética como resultado de la diversidad alélica en un solo gene, según Drenth y Govers (1994). Los aislamientos del grupo A1 colectados antes de 1980 presentaron los alelos 86 y 100 en *Gpi* (glucosa isomerasafosfato) y los alelos 92 y 100 en *Pep* (peptidasa). En aislamientos del grupo A1 y A2 colectados después de 1980, los alelos *Gpi* 86 y *Pep* 92 fueron reemplazados por los

alelos 90 y 83, respectivamente (Spielman *et al.*, 1991). Ambos alelos están presentes en aislamientos de México. Estas observaciones y el análisis de los perfiles de hibridación de ADN de poblaciones de *P. infestans* apoyan la hipótesis de una reciente introducción.

La aparición más probable del grupo de compatibilidad A2 puede ser explicada por una introducción de México por actividades humanas tales como el comercio de papas para el consumo doméstico y productos frescos (tomates), o el transporte de suelo con oosporas (Drenth *et al.*, 1993; Fry *et al.*, 1993). Esta hipótesis es la más aceptada para explicar la aparición de la amplia diseminación del grupo de compatibilidad A2.

2.9.- Ciclo de la enfermedad.

En las áreas tropicales donde se cultiva papa todo el año, la fase de invernación de *P. infestans* no tiene importancia; sin embargo, en lugares donde la diferencia de las estaciones es marcada, la invernación del hongo se hace en forma de micelio, ya sea en los tubérculos de plantas voluntarias, en los tubérculos desechados que se apilan cerca del campo de cultivo y de almacenes o en los que se almacenan para semilla (Thurston y Schultz, 1981).

El micelio se propaga en los tejidos de los tubérculos de papa y por último llega a unos cuantos de los brotes que se formaron a partir de los tubérculos infectados que se utilizan como semilla. Dicho micelio se desarrolla entre las células medulares del tallo, pero rara vez se le encuentra en el sistema vascular. El micelio crece a través del tallo y llega a la superficie del suelo. Cuando el micelio alcanza las partes aéreas de las plantas, produce esporangióforos que emergen a través de los estomas de las hojas y del tallo y se proyectan al aire. Los esporangios que producen los esporangióforos se desprenden y son diseminados por la lluvia o bien son llevados por las corrientes de aire cuando han llegado a la madurez. Al depositarse sobre las hojas o tallos húmedos de las plantas de papa, los esporangios germinan y producen nuevas infecciones, si la temperatura oscila entre 10 y 25°C. El esporangio libera zoosporas, las cuales son móviles en agua, después se enquistan y producen un tubo germinativo que penetra dentro del tejido del hospedante. Este proceso requiere aproximadamente de ½ a 2 ½ horas, dependiendo de la temperatura y de las condiciones de la planta hospedante. Los esporangios también pueden formar tubos germinativos e infectar directamente a la planta. El tubo germinativo penetra la cutícula de la

hoja o entra a través de un estoma y forma un micelio que crece profusamente entre las células y envía haustorios largos enrollados hacia el interior de ellas. Las células en las que el micelio se nutre tarde o temprano mueren y conforme empiezan a degradarse, el micelio del hongo se propaga periféricamente en los tejidos carnosos de las hojas. Al cabo de unos días después de haberse producido la infección, emergen nuevos esporangióforos a través de los estomas de otras plantas. En un clima favorable, el periodo comprendido entre la aparición de la infección y la formación de los esporangios puede durar tan sólo cuatro días, y como consecuencia, pueden producirse en una sola estación de crecimiento nuevas infecciones y numerosas generaciones asexuales del hongo. Conforme avanza la enfermedad, las lesiones previas continúan extendiéndose y aparecen otras de ellas, dando como resultado la muerte prematura del follaje y una disminución proporcional en la producción de tubérculos (Agrios, 1995).

La segunda fase de la enfermedad, o sea la infección de los tubérculos, se produce en el terreno de cultivo durante tiempo lluvioso, cuando los esporangios son arrastrados de las hojas y transportados hacia el suelo. Los tubérculos de papa que se localizan cerca de la superficie del suelo son atacados por las zoosporas que han sido liberadas y que germinan, y penetran en ellos a través de heridas o lenticelas. En el tubérculo, el micelio se desarrolla principalmente entre las células y envía sus largos haustorios en forma de hoz hacia el interior de ellas. Los tubérculos rara vez son infectados por el micelio que crece hacia la parte inferior del tallo de una planta enferma. Sin embargo, si durante la cosecha los tubérculos son contaminados por esporangios todavía presentes en el suelo o bien si estos tubérculos son expuestos en tanto el hongo se encuentre esporulando en el follaje parcialmente enfermo de algunas plantas, es muy probable que se produzca otra infección que en principio no se hizo evidente, pero la cual más tarde se desarrolla durante el almacenamiento de los tubérculos. La mayoría de los tubérculos que han sido infectados se pudren en la tierra o bien cuando son almacenados (Agrios, 1995).

Además de la fase asexual, *P. infestans* tiene un medio de reproducción sexual. Este requiere de la infección y crecimiento del micelio en el tejido de la planta de papa. Sin embargo, esto es más raro en la naturaleza, ocurriendo únicamente cuando existen los dos grupos de compatibilidad diferente y están en contacto dentro de la misma planta. Después

los dos grupos producen los gametangios masculino (anteridio) y femenino(oogonio), ocurre el intercambio genético y el desarrollo de la oospora. Esta puede germinar por medio de un tubo germinal que forma un esporangio apical, el cual puede liberar zoosporas o formar un tubo germinal (Smoot *et al.*, 1958; Platt, 1992).

2.10.- Epidemiología.

El desarrollo epidémico del tizón tardío depende en gran parte del efecto que tiene la humedad y la temperatura sobre las distintas etapas del ciclo de vida del hongo, el cual muestra una mayor esporulación a una humedad relativa (HR) del 100% (91-100%) y a temperaturas entre 16 y 22°C. Los esporangios pierden su viabilidad al cabo de 3 a 6 horas a HR por debajo del 80%. Extensos períodos secos o una deshidratación rápida pueden matar rápidamente muchos esporangios, pero dentro de una temperatura de 15 a 20°C y 40 a 80% de HR, la rehidratación lenta prolonga más la vida media en comparación a una rehidratación rápida (Minogue y Fry, 1981). La temperatura óptima para la germinación indirecta, esto es produciendo zoosporas es de 12°C, mientras que la germinación directa por formación de un tubo germinativo se realiza a 24°C; a pesar de ello, ambas formas de germinación pueden realizarse en condiciones similares de temperatura. Las zoosporas producen un tubo germinativo y apresorio en presencia de agua libre y la penetración se realiza penetrando en los tejidos; el micelio del hongo se desarrolla con mayor rapidez dentro del intervalo de temperatura de 17 a 21°C, el cual es también óptimo para esporular. Las temperaturas mayores a los 30°C inhiben el desarrollo del hongo en el campo, pero no lo destruyen, de ahí que pueda esporular de nuevo cuando la temperatura sea favorable, pero siempre y cuando la HR sea suficientemente alta (Thurston y Schultz, 1981; Agrios, 1995).

La diseminación continua de la enfermedad depende de las condiciones climáticas y del hospedante. La edad y posición de las hojas sobre la planta afecta el grado de susceptibilidad, las hojas más bajas y viejas son más susceptibles (Carnegie y Colhoun, 1982, citado por Platt, 1992). Asimismo, la epidemia progresa a una tasa más lenta en plantas de edad intermedia que en plantas más viejas, particularmente para variedades de maduración tardía (Fry y Apple, 1986). La tasa de desarrollo de la enfermedad, incluyendo la esporulación, es afectada por el grado de resistencia general y madurez. Mientras que las

plantas jóvenes y viejas son más susceptibles que aquellas de edad intermedia, la tasa de esporulación disminuye a medida que la edad de la planta se incrementa (Rotem *et al.*, 1983). La intensidad de luz afecta el desarrollo de la enfermedad, con intensidades altas se reduce la invasión micelial y el tamaño de la lesión en comparación a intensidad de luz baja (Victoria y Thurston, 1974). La diseminación de la enfermedad también es más rápida cuando la canopia es más densa, lo cual resulta en condiciones microclimáticas alteradas, con humedad más alta y temperaturas más frías (Hirst y Stedman, 1960, citado por Platt, 1992). Estos factores también afectan la esporulación del hongo sobre el tejido y por tanto el desarrollo continuo de una epidemia.

Los esporangios llevados por la lluvia de las hojas infectadas pueden invadir a los tubérculos, particularmente a aquellos cercanos a la superficie del suelo. La infección es principalmente a través de los ojos, lenticelas y heridas, y ocurre en unos pocos días después de una lluvia. La temperatura del suelo también está involucrada, ocurre mayor pudrición de tubérculos en suelos húmedos y fríos que en suelos secos y calientes, y la incidencia de la pudrición de tubérculos disminuye a medida que la temperatura se aproxima a 18°C. La esporulación puede ocurrir aproximadamente una semana después de la infección. Se ha encontrado que la desecación del follaje de la planta disminuye la resistencia a la pudrición de tubérculos después de la cosecha, lo cual es un tiempo crucial para la infección. La diseminación de tubérculos con pudrición por tizón tardío normalmente no es un problema en el almacén, pero los tubérculos dañados y expuestos a inóculo durante la cosecha pueden desarrollar síntomas en el almacén. El hongo sobrevive bajo condiciones de temperatura y humedad que son normales para la supervivencia de los tubérculos, esto permite que se regenere el ciclo de la enfermedad cuando el tubérculo es plantado o crece como una planta voluntaria en el campo o en los lugares donde se apilan cerca del campo o almacén (Platt, 1992).

Las oosporas constituyen una fuente de inóculo primario potencialmente amenazante en áreas donde ocurren simultáneamente ambos grupos de compatibilidad, pero los factores y mecanismos que inducen la germinación de las oosporas están todavía poco entendidos.

2.11.- Variabilidad patogénica.

El primer registro de la variabilidad patogénica en *P. infestans* fue hecho por Giddings y Berg (1919), quienes observaron que los aislamientos de papa fueron patogénicos únicamente a papa, mientras que aquellos de tomate fueron más patogénicos a papa que a tomate.

En 1938, Reddick y Mills, en Nueva York, observaron que el patógeno aumentaba progresivamente su virulencia mediante transferencias sucesivas en variedades resistentes. En Holanda, De Bruyn, trabajando al principio con cultivos puros procedentes de una zoospora inoculada en tubérculos resistentes, logró aislar cultivos puros de elevada virulencia sobre estos últimos. Mills (1940) observó un fenómeno similar sobre tomate. Sus observaciones fueron consideradas durante un cierto tiempo como una posible respuesta de adaptación al sustrato, pero estudios posteriores han sugerido la posibilidad de que el hongo sufre frecuentes mutaciones en cuanto a su carácter patogénico (Walker, 1965).

Según Salaman (1926), citado por Calderoni (1975), los primeros intentos para resistencia a tizón tardío en papa se iniciaron en 1851, entre variedades de *Solanum tuberosum*, pero la resistencia obtenida no duró largo tiempo. Shick, en 1932, al utilizar plantas de papa con germoplasma de la especie *S. demissum*, la cual ahora sabemos que tiene genes de resistencia, encontró por primera vez la presencia de razas fisiológicas; ésto ocurrió algunos años después de la introducción de variedades resistentes a tizón tardío a partir del cruzamiento de las dos especies de *Solanum* mencionadas.

La pérdida de resistencia a tizón tardío se observó desde 1932 en Europa (Muller, 1933) y en Estados Unidos (Reddick y Crosier, 1933), citado por Turkensteen (1993). Al intervenir *S. demissum* como portador de genes de resistencia, se pensó resuelto el problema, pero los clones obtenidos fueron atacados por nuevos biotipos. Esta habilidad patogénica, puso de manifiesto la existencia de razas fisiológicas.

A partir de lo antes mencionado, ha sido posible obtener un grupo de plantas con diferentes tipos de resistencia para que en ellas el hongo pueda manifestar sus diferentes capacidades de patogenicidad. Entonces, en 1952 Mills y Peterson, en los Estados Unidos, Mastenbroek en Holanda y Black en Inglaterra, usando plantas diferenciales obtenidas de

híbridos entre *S. tuberosum* y *S. demissum*, identificaron 6, 8 y 11 razas, respectivamente (Galindo, 1958).

En cada uno de los trabajos anteriores se usó un sistema diferente para denominar tanto a las razas como a los genotipos, por lo que ninguno de estos investigadores podía saber la relación de sus resultados con los resultados publicados en los otros dos trabajos. Con el fin de resolver este problema todos estos investigadores compararon sus plantas diferenciales con las que habían determinado sus razas, encontrando que los genotipos para resistencia de estas plantas, estaban formados por la misma clase de genes. Por esta razón propusieron un sistema internacional de nomenclatura para la designación de las diferentes razas de *P. infestans* y los genes que controlan la resistencia en *S. demissum*; adoptando la nomenclatura usada por Black y basando su análisis sobre el concepto de gene por gene (Black *et al.*, 1953).

A los genes que controlan, por efecto de hipersensibilidad, a razas de *P. infestans* y derivados de *S. demissum*, se les denominó R1, R2, R3 y R4. Por medio de hibridaciones adecuadas y retrocruzas cada gene que se hereda en forma independiente y como dominante simple en la segregación mendeliana, fue posible lograr la combinación de los cuatro genes. La combinación de los genes mencionados ha permitido la obtención de 15 clones, y los genotipos que se pueden formar son los siguientes: (R1), (R2), (R3), (R4), (R1R2), (R1R3), (R1R4), (R2R3), (R2R4), (R3R4), (R1R2R3), (R1R2R4), (R1R3R4), (R2R3R4) y (R1R2R3R4). Con plantas que poseen estos genotipos, mas otro completamente susceptible (r), es posible identificar 16 razas ($2^4=16$ razas. Ver Cuadro 2). Los genes *demissum* R son altamente resistentes a la forma silvestre de *P. infestans* normal sobre *S. tuberosum* a la que se designa como raza 0. Las razas son denominadas con números y de acuerdo al genotipo más complejo de la planta a la que es capaz de atacar, por ejemplo: si un aislamiento de *P. infestans* al inocularla sobre las diferenciales ataca a plantas con genotipos (r), (R1) y (R3), pero no a aquellos genotipos en los que se encuentren genes R2 y R4, recibirá el nombre de raza 1,3. Una planta con el gene R1 es susceptible a la raza 1 ó a cualquier otra raza con el número 1 en su designación, pero resistente a las razas 2, 3 y 4 ó razas con 2, 3, ó 4 en cualquier combinación en su designación. De igual forma, una planta con el gene R2 es susceptible a la raza 2, pero es resistente a las razas 1, 3 y 4. Una planta con los dos genes

R1 y R2 es susceptible a la raza 1.2, ó a cualquier otra raza con ambos números 1 y 2, pero es resistente a otras razas (Galindo, 1958; Calderoni, 1975; Walker, 1965; Vanderplank, 1984).

El sistema de nomenclatura propuesto por Black *et al.* (1953) permitía la identificación de 16 razas de *P. infestans*, siendo la raza 1.2.3.4., la más compleja. Pero tiempo después, se registraron razas más complejas la 1.2.3.4.5, la 1.2.3.4.6 y la 1.2.3.4.5.6 (Eide, Borde, Gallegly, Graham, Mills, Niederhauser y Wallin, 1959). Así, se registraron los genes R5 y R6 en dos clones de *S. demissum*, 3053-18 y XD2-21, de Canada, y para su designación se siguió el sistema de nomenclatura original a fin de mantener un sistema comparativamente simple. Las razas de *P. infestans* capaces de atacar a los genotipos R5 ó R6, o ambos, se observaron en aislamientos del Reino Unido y otros países (Malcolmson y Black, 1966).

Posteriormente, Malcolmson y Black (1966) reportaron tres nuevos genes mayores para hipersensibilidad de *S. demissum*, designándolos como R7, R8 y R9. Además, identificaron nueve nuevas razas, cada una capaz de superar la hipersensibilidad inducida por al menos uno de los nuevos genes y todas originadas de la raza 1.2.3.4.

Actualmente, se reconocen once genes R derivados de *S. demissum*, designados como R1 a R11, portados por un juego de clones diferenciales en la serie de Black (Wastie, 1991).

2.11.1.- Concepto de raza fisiológica.

Desde principios de este siglo ya sea habían observado variaciones en la virulencia con respecto a las variedades de un hospedante (Barrus, 1911). Estas variaciones se llamaron razas fisiológicas (Stakman, 1914) o, más brevemente razas (Parlevliet, 1985). A continuación se presentan algunas definiciones de este concepto.

Conjunto aleatorio de virulencias y avirulencias, determinado externamente por adaptación a los hospedantes e internamente por interacciones inter o intraalélicas, todos sujetos a control ambiental (Vanderplank, 1984).

Cuadro 2. Relación entre genes de resistencia de papa y razas de *Phytophthora infestans* de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura (Black *et al.*, 1953).

GENE(S)	R A Z A															
	0	1	2	3	4	1.2	1.3	1.4	2.3	2.4	3.4	1.2.3	1.2.4	1.3.4	2.3.4	1.2.3.4
r	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
R1	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S
R2	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S
R3	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S
R4	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S
R1,R2	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S
R1,R3	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S
R1,R4	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S
R2,R3	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S
R2,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S
R3,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S
R1,R2,R3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
R1,R2,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
R1,R3,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S
R2,R3,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
R1,R2,R3,R4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

S: la planta es susceptible y R: la planta es resistente.

Una población en la cual todos los individuos portan la misma combinación de genes de virulencia. Un genotipo del patógeno caracterizado por una combinación específica de factores de virulencia. Por lo que una raza se define únicamente sobre la base de sus genes de virulencia, y éstos sólo pueden ser observados cuando se exponen a los correspondientes genes de resistencia (Parlevliet, 1985 y 1994).

Conjunto aleatorio de virulencias y avirulencias determinado en una serie de hospedantes diferenciales (Roelfs *et al.*, 1992).

2.11.2.- Origen de las razas fisiológicas.

En la naturaleza la mayoría de las razas fisiológicas se originan por mutación (Toxopeus, 1956, Gallegly, 1968). La reproducción sexual también puede ser una fuente importante del desarrollo de razas, sobre todo en los lugares donde coexisten los dos grupos de compatibilidad (Romero y Erwin, 1969). Alguna variación puede ser generada por un ciclo parasexual (Leach y Rich, 1969), o también estar bajo control citoplásmico (Caten y Jinks, 1968). La reciente confirmación de la ocurrencia del grupo A2 en la mayoría de los países productores de papa en el mundo, puede sugerir una mayor importancia de la recombinación sexual (hibridación) como mecanismo de variabilidad en *P. infestans*. Sin embargo, la mutación y/o recombinación mitótica pudo haber contribuido a la variación en virulencia (razas) en lugares donde únicamente el grupo A1 ha existido. Algunos grupos de aislamientos que fueron monomórficos para alozimas, RLFPs y grupo de compatibilidad, se ha demostrado que son polimórficos en loci de virulencia/avirulencia. Por ejemplo, las alozimas han indicado bajos niveles de diversidad en las poblaciones de *P. infestans* en el Reino Unido antes de 1980, pero Shattock *et al.* (1977) encontraron aislamientos con un mayor número de virulencias específicas que pueden tener origen por mutación y/o recombinación mitótica (Fry *et al.*, 1992).

Con la serie de diferenciales de Black *et al.* (1953) en 1956, se completo en México, el reconocimiento de 16 razas fisiológicas, número mayor al registrado en cualquier otro país del mundo. La razón parecía obvia: esta variación del patógeno en México no podía deberse únicamente a mutación, sino a otro mecanismo, la hibridación, muy posible al encontrarse en el campo los dos grupos de compatibilidad. La comprobación llegó en 1969,

cuando Romero y Erwin, al cruzar un aislamiento raza 0 por otro aislamiento raza 1.2.3.4, obtuvieron una progenie de cultivos mono-oospóricos con genotipos muy variados (raza 0, raza 1, raza 2, etc.), indicativos de la capacidad de *P. infestans* para generar nuevos biotipos por hibridación (Romero, 1988), lo cual también ha sido sugerido por estudios anteriores y posteriores (Gough, 1957; Smoot *et al.*, 1959; Savage y Gallegly, 1960; Niederhauser, 1961; citados por Gallegly, 1968).

Laviola y Gallegly (1983) confirmaron y ampliaron los resultados de Romero y Erwin (1967) sobre la ocurrencia de recombinación sexual en *P. infestans*. Sus resultados indican que a través del proceso sexual los caracteres de patogenicidad se unen o segregan independientemente, aparentemente en una forma simple mendeliana.

2.11.3.- Razas fisiológicas de *P. infestans* en México.

La determinación de razas en México fue iniciada en 1952 por Mills y Niederhauser. La forma como lo hicieron, fue sembrando en el Valle de Toluca un grupo de plantas diferenciales mas 134 selecciones de papa con genotipo R1,R2, las cuales se habían comportado como resistentes en los Estados Unidos. Después de poco tiempo todas esas plantas mostraron lesiones, indicando con ello la existencia de un número mayor de razas a las presentes en los Estados Unidos. Más tarde, Servin (1954), De la Fuente (1955), citados por Galindo (1958), aislaron e identificaron las 16 razas posibles de determinar y de las cuales algunas estaban como teóricas solamente (basándose en los cuatro genes R descritos). Niederhauser *et al.* (1954) encontraron que en un clon de *S. demissum* que se había comportado resistente a la raza 1.2.3.4, llegó a ser atacado por otra cepa, indicando con ello la existencia de razas aún mas patógenas o especializadas que la 1.2.3.4.

Graham *et al.* (1956) encontraron en el Valle de Toluca una alta proporción de razas 0, 1, 2 y 4 sobre *S. tuberosum*. Las razas mas complejas, tales como, 1.2.4, 1.3.4 y 1.2.3.4, se obtuvieron de líneas de *S. demissum* y de híbridos de las dos especies antes mencionadas.

Rivera-Peña (1990) realizó una investigación de razas de *P. infestans* durante 1985 y 1986 en la pendiente oeste del Volcán Nevado de Toluca, México. El analizó aislamientos colectados de plantas infectadas de especies silvestres de *Solanum* (la mayoría de *S. demissum*, con 35) entre 2900 y 3900 m de altitud. De 71 aislamientos probados (de 77

colectados) para virulencia, usando un juego de plantas diferenciales con los genes de resistencia R1 a R11 (excepto R6) y a la variedad López como testigo susceptible (r), identificó 48 razas. Ninguno fue raza 0, pero todos los otros genes de virulencia se identificaron. La mayoría de estos se presentaron en 60-70% de los aislamientos y los más comunes fueron los genes 2 y 4, los que se presentaron en 77% y 79% de los aislamientos, respectivamente. El gene de virulencia 9 fue el menos frecuente (en 22% de los aislamientos), al igual que el gene 8 (40% de los aislamientos). Los aislamientos con ocho genes de virulencia fueron los más comunes (15 de 71=21%), seguidos por aquellos con nueve y diez genes cada uno. Además, no encontró diferencias respecto a altitud en la frecuencia de genes de virulencia o de complejidad de razas.

Este mismo autor señala que la frecuencia de genes de virulencia encontrados en su investigación confirman parcialmente las observaciones hechas en 1976-1977 en el campo experimental de Toluca, donde la raza 4 fue la más común en condiciones naturales y las razas 8 y 9 las menos comunes.

La gran cantidad de razas existentes en México y especialmente en el Valle de Toluca, han hecho de este lugar un centro internacional para probar en una forma severa la resistencia de las progenies de papa resultantes en los programas de mejoramiento en otros países (Galindo, 1958; Niederhauser, 1986).

2.11.4.- Razas fisiológicas de *P. infestans* fuera de México.

En Alemania, antes de 1950, la raza 0 fue la más común, pero entre el período de 1950 a 1990 ocurrió un incremento en la diversidad del contenido de genes de virulencia y en el número de genes de virulencia por aislamiento en las poblaciones de *P. infestans*. Así, en 1985, de 47 aislamientos colectados, se identificaron 14 razas diferentes (Schöber y Turkensteen, 1992).

Shattock *et al.* (1977) registró un rango amplio de razas diferentes de *P. infestans* en el Reino Unido entre 1970 y 1973. Las razas con tres ó más genes de virulencia específica fueron las más frecuentes.

De 77 aislamientos de *P. infestans* colectados en 1988 en Holanda, se identificaron 27 razas, siendo más frecuente la raza 1.3.4.7.10.11 (Schöber y Turkensteen, 1992). Drenth

et al. (1994), en este mismo país, encontraron ocho razas diferentes de aislamientos colectados antes de 1980, siendo los genes de virulencia 1, 2, 3, 4 y 10 los más comunes. Después de 1980, aparecieron nuevos genes (5, 6, 7, 8 y 11) indicando un tremendo incremento en la diversidad para virulencia, detectándose 73 razas de 253 aislamientos analizados.

Andrison (1994a) identificó 19 razas de 116 aislamientos de *P. infestans* colectados durante 1991-1993 en los cultivos de papa y tomate en Francia. Las razas más comunes fueron: 1.3.4.7.11, 1.3.4.7.8.11 y 1.3.4.7.10.11 en 1991, la raza 1.3.4.7.11 en 1992 y la raza 1.3.4.7.10.11 en 1993. Ninguno de los aislamientos fue virulento para los genes R2 ó R6, y únicamente uno para R5. El número medio de genes de virulencia por aislamiento fue 5.78 en 1991, 4.35 en 1992 y 4.53 en 1993.

Sujkowski *et al.* (1996) estudiaron la virulencia específica de 95 aislamientos de *P. infestans* colectados en Polonia de 1985-1991 y determinaron 22 razas, siendo más comunes las razas 1.2.3.4.7.10.11 y 1.2.3.4.5.7.10.11.

Generalmente, unas pocas razas dominan en las poblaciones de *P. infestans* en Europa. Las razas más frecuentes en varios países son las: 1.3.4.7.10.11 y 1.3.4.7.8.10.11, pero la raza 1.3.4.7.11 y 1.3.4.6.7.8.10.11 también son importantes, la última, especialmente en Suiza e Israel durante 1994/95 (Gisi y Cohen, 1996).

La existencia de razas fisiológicas en los Estados Unidos parece ser diferente: en 1992-1994 aproximadamente la mitad de los aislamientos probados presentaron de cero a cuatro genes de virulencia; mientras que la otra mitad de seis a nueve genes (Goodwin *et al.*, 1995, citado por Gisi y Cohen, 1996).

Las primeras razas de *P. infestans* identificadas en China fueron la 0, 1.4 y 1.3.4. En la década de 1960, los aislamientos presentaron las razas 0, 1, 4, 1.4, 2.4 y 1.3.4, prevaleciendo la raza 4 en 63% de los aislamientos. En 1990 se detectaron las razas 6, 7, 8 y 10 (Zhiming, 1996).

2.11.5.- Herencia de la virulencia de *P. infestans*.

Varios investigadores han demostrado la segregación de virulencia en la progenie F1 (Romero y Erwin, 1969; Gallegly, 1968; Laviola y Gallegly, 1983).

Al-Kherb (1988), citado por Spielman *et al.* (1990), observó segregaciones que sugieren un solo locus para el control de virulencia contra los genes de papa R1, R2, R3 y R4, con avirulencia dominante. Spielman *et al.* (1990) no pudo verificar estos resultados en todos los aspectos. La virulencia apareció ser dominante y controlada por un solo locus contra los genes R2 y R4. La avirulencia contra R3 parece ser dominante y posiblemente controlada por dos loci en el hongo.

Swah (1990) al analizar la progenie de cinco apareamientos, establece que opera un sistema gene por gene, donde los alelos para avirulencia son dominantes sobre los alelos para virulencia y que los progenitores avirulentos son frecuentemente heterocigotos en su loci para virulencia. El mismo autor, en 1994, al analizar los resultados de herencia de la virulencia en la progenie de 13 apareamientos obtenidos por varios investigadores, indica que la mayoría de los datos apoyan la hipótesis de que un solo gene en el patógeno condiciona la habilidad para atacar una diferencial portando un solo gene de resistencia. Además, como generalmente es aceptado, para la mayoría de los patosistemas estudiados, los alelos para avirulencia son dominantes y los alelos para virulencia recesivos en cada locus génico.

Los resultados de Spielman *et al.* (1990) también apoyan la hipótesis de gene por gene en *P. infestans*, indicando que la virulencia contra R2 es controlada por un solo locus; mientras que la virulencia contra R4 puede estar determinada por uno ó dos loci, ya que la segregación de virulencia/avirulencia se aparta de la proporción 1:1. Respecto a esto último, Al-Kherb *et al.* (1995) reporta resultados similares, proponiendo una hipótesis alternativa para explicarlos que incluye una baja agresividad en una parte de la progenie, un segundo locus inhibiendo la avirulencia en un progenitor, un locus diferente en cada progenitor determinando virulencia/avirulencia sobre un gene R, y dominancia de algunos alelos determinando virulencia. Además, observaron segregación somática resultado de recombinación somática en un aislamiento progenitor.

2.11.6.- Prueba de virulencia.

Para las pruebas de virulencia se usa el juego de clones de papa diferenciales, cada uno teniendo uno de los genes R1 - R11 y sus combinaciones (Black *et al.*, 1953;

Malcolmson y Black, 1966), además de una variedad sin alguno de tales genes. Estos clones difieren considerablemente en tipo de planta, forma y tamaño de la hoja, madurez, dormancia de tubérculo, producción de tubérculos y reacción al fotoperiodo, pero también con respecto a resistencia residual; por lo que se ha establecido un programa para producir una serie de diferenciales más uniforme usando como progenitor hembra a la variedad Blidstar muy susceptible (Schöber y Turkensteen, 1992).

Las diferenciales R1, R3, R6, R8 y R9 producen una reacción típica de hipersensibilidad, mientras que las R4, R2, R10 y R11, presentan un orden decreciente en su reacción de resistencia, produciendo una mezcla de lesiones como pecas y lesiones de expresión lenta y esporulación pobre. Para las pruebas de virulencia, comúnmente, se usan hojas desprendidas. Las condiciones bajo las cuales crecen las plantas en el invernadero, especialmente las concernientes a fotoperiodo e intensidad de luz, así como bajo las cuales se alojan los folíolos durante la prueba tienen un impacto importante sobre la expresión de la reacción hipersensitiva, y por lo tanto, de los resultados de la prueba. De forma similar, las hojas jóvenes y viejas pueden diferir en su reacción de hojas de edad intermedia y la expresión de síntomas es menor sobre el haz. Además, la inoculación por colocación de gotas o por aspersión, el tamaño de la gota y la densidad del inóculo tienen un impacto importante (Schöber y Turkensteen, 1992).

A continuación se indican las condiciones mas apropiadas para llevar a cabo las pruebas de virulencia, tal como lo reportan varios investigadores como Tooley *et al.* (1986), Spielman *et al.* (1990), Andrivon (1994a), entre otros.

Para las pruebas se usan más comunmente folíolos desprendidos y completamente expandidos de hojas jóvenes de la parte media de la planta (4°-7° nudo) y de plantas de edad intermedia (6-12 semanas). Las plantas diferenciales se cultivan en el invernadero bajo las condiciones apropiadas para su desarrollo en cuanto a nutrición, fotoperiodo y régimen de humedad, similares a las recomendadas para su cultivo en campo. Los folíolos se desprenden de las hojas y se mantienen con el haz hacia arriba, sobre papel filtro húmedo en cámara húmeda (cajas Petri o bolsas de plástico). Además, puede colocarse un algodón sobre los peciolos cortados para prevenir su desecación.

Se prepara una suspensión de esporangios de los aislamientos a probar a partir de cultivos (creciendo en medios de centeno, jugo V8 o chícharo-agar) por lavado con agua destilada estéril se colectan los esporangios y se ajusta a una concentración entre $0.5 - 1.5 \times 10^5$ esporangios ml^{-1} . En algunos casos es necesario pasar los aislamientos de medio-agar a foliolos o rebanadas de tubérculos de alguna variedad susceptible para restaurar la patogenicidad o la capacidad de esporulación, los esporangios se colectan en agua destilada estéril de lesiones con esporulación de 6 a 7 días de edad para usarse como inóculo.

Los foliolos se inoculan con una o dos gotas de 50 μl de las suspensiones esporangiales, al lado de la nervadura central y se incuban por 6 días a 18°C y 16 horas luz por día en una incubadora con iluminación. Para cada aislamiento, se inoculan de 2 a 5 foliolos de cada genotipo diferencial.

La reacción, resultado de la interacción entre el hongo y los genotipos de papa se registra después de 6 días de incubación, de la siguiente forma: compatible o positiva (crecimiento micelial extenso y esporulación abundante), incompatible o negativa (puntos o manchas limitadas o ausencia de reacción visible). Un aislamiento se considera virulento a un hospedante dado si al menos tres (de 5) de los foliolos producen una interacción compatible. En contraste, avirulento.

2.12.- Interacción hospedante-patógeno.

2.12.1.- Histología y citología.

Los eventos histológicos y citológicos en la interacción papa y *P. infestans* han sido revisados por Coffey y Gees (1991) y por Umaerus y Umaerus (1994). La secuencia de eventos en la interacción se describe con detalle en las revisiones hechas por Coffey y Wilson (1983) y Clarke (1983).

El desarrollo del tizón tardío de la papa depende de la agresividad del patógeno y de la respuesta de defensa del hospedante. Las zoosporas de todas las razas germinan con igual eficiencia sobre variedades resistentes y susceptibles y también la frecuencia es similar (Gees y Hohl, 1988). En interacciones compatibles así como incompatibles, las células del hospedante inicialmente invadidas reaccionan hipersensiblemente y producen un material

parecido a calosa unas pocas horas después de la inoculación (Cuypers y Haklbrock, 1988, citado por Pieterse *et al.*, 1992). Sin embargo, en la interacción incompatible, las células epidérmicas y del mesófilo adyacentes a las células invadidas se tornan necróticas dentro de 5 horas después de la inoculación, mientras en la interacción compatible estas células no se tornan necróticas dentro de las primeras 12-24 horas. Por lo tanto, en general se puede establecer que en comparación con interacciones compatibles, en interacciones incompatibles las células del hospedante responden a *P. infestans* más rápidamente por desencadenamiento de la reacción de hipersensibilidad.

2.12.2.- Bioquímica o molecular.

La bioquímica de la interacción hospedante -patógeno en *Solanum-P. infestans*, ha sido sujeto de varias revisiones recientes (Preisig y Kuc, 1987; Tomiyama, 1989, citados por Umaerus y Umaerus, 1994; Friend, 1991; Hohl, 1991; Parker *et al.*, 1991).

A continuación se presentan las conclusiones de varias investigaciones que se han realizado sobre la interacción molecular, tal como las citan Pieterse *et al.* (1992) o Umaerus y Umaerus (1994).

Compuestos fenólicos.

Tomiyama (1989) indica que en la respuesta de defensa por hipersensibilidad cooperan los compuestos fenólicos y sesquiterpenoides para proteger al tejido del crecimiento micelial de *P. infestans*. La interacción en las paredes de las células del hospedante se considera ser causada por productos de oxidación desencadenados por la muerte de las células.

Fitoalexinas.

Las fitoalexinas son moléculas antimicrobianas las cuales son producidas por la planta después de la infección, tratamiento inductor o al causar heridas. En los tubérculos de papa, la producción de fitoalexinas ocurre principalmente vía la biosíntesis de terpenoides, resultando en sesquiterpenoides tales como riquitina, fituberina y lumina. Después de la infección de tubérculos de papa con *P. infestans* se producen fitoalexinas y entonces se transportan dentro de las células parduzcas donde se pueden acumular a altas concentraciones (Sato *et al.*, 1971). Rohwer *et al.* (1987) estudió la acumulación de

fitoalexinas en una interacción compatible y una incompatible. En tubérculos de papa, encontraron una acumulación más rápida de sesquiterpenoides durante las primeras 24-48 horas después de la infección en la interacción incompatible comparado a una compatible. En hojas infectadas no se han detectado fitoalexinas. Esto sugiere que al menos en las hojas, estos compuestos no son necesarios para la defensa contra *P. infestans*.

Proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR).

Las proteínas PR son un grupo característico de proteínas de la planta, las cuales se acumulan después de la infección, tratamiento inductor y a veces durante la senescencia.

Pierpoint *et al.* (1990) reportaron la presencia de proteínas PR en papa, una proteína semejante a la taumatina, quitinasa y β -1,3-glucanasa. Sin embargo, no hay evidencias directas de que estas proteínas, así como de que otras estén involucradas en la resistencia contra *P. infestans*.

3.- SENSIBILIDAD DE *Phytophthora infestans* A metalaxyl.

3.1.- El fungicida metalaxyl.

El metalaxyl (N (2,6-dimetil)-N-(metoxiacetil)-(alanina metil éster) es un fungicida fenilamida sistémico altamente activo (preventivo, curativo y erradicativo) contra hongos oomicetos. Este fungicida fue introducido a finales de la década de 1970 (Urech *et al.*, 1977) y es usado a nivel mundial para combatir mildiús y enfermedades causadas por *Phytophthora* en varios cultivos (Cohen y Coffey, 1986). A nivel comercial, fue primeramente usado en 1977 en algunos países de Europa para el control de *Phytophthora infestans* en papa (Shattock, 1988).

La molécula de metalaxyl posee una alta fungitoxicidad e inhibe el crecimiento micelial de *P. infestans* con valores de CE_{50} entre 0.1 - 0.5 ppm. La esporulación del hongo es particularmente inhibida fuertemente a concentraciones mucho más bajas que aquellas necesarias para la inhibición del crecimiento micelial (Bruck *et al.*, 1980). El metalaxyl tiene poco o nulo efecto sobre la germinación de los esporangios o zoosporas, o sobre la movilidad de estas últimas. En contraste a los fungicidas protectantes, los cuales son

fungitóxicos a la espora por si mismos o al tubo germinativo de esta sobre la superficie del hospedante, el metalaxyl únicamente ejerce su efecto fungitóxico dentro del tejido del hospedante. La penetración y la formación de los primeros haustorios no es afectada pero después cualquier desarrollo posterior del patógeno es inhibido fuertemente. Cuando se aplica bajo infecciones ya existentes, se observa un fuerte efecto curativo. El metalaxyl es absorbido muy rápidamente por las raíces, tallos verdes y hojas de papa y tomate, y es translocado acropetalamente. Bajo condiciones de alta humedad, por ejemplo, aquellas que son favorables para la infección por el patógeno, son particularmente apropiadas para una distribución rápida dentro de la canopia. El modo de acción bioquímico del metalaxyl es la inhibición de la síntesis de ARN en el hongo por la inhibición de la ARNr polimerasa (Schwinn y Margot, 1991).

En el cultivo de papa, el metalaxyl a dosis de 200-250g i. a. ha⁻¹ da protección de 10 a 15 días. La molécula es particularmente efectiva en plantas jóvenes con crecimiento activo y ofrece protección no únicamente al follaje existente, sino también al nuevo crecimiento el cual ocurre antes de que la próxima aspersión deba ser aplicada. Este período de protección es debido parcialmente a la persistencia del compuesto en el tejido y parcialmente a sus propiedades curativas. El efecto curativo sobre lesiones existentes es menos marcado y usualmente es necesario una segunda aspersión después de 5 a 7 días para detener completamente el desarrollo de las lesiones y la esporulación (Schwinn y Margot, 1991).

El tratamiento del follaje con metalaxyl resulta en un nivel alto de protección del tizón en tubérculos. Esto es en parte debido a su excelente actividad antiesporulante, la cual reduce drásticamente la fuente de zoosporas de las lesiones foliares, sino también se debe a cantidades pequeñas pero suficientes biológicamente activas del compuesto (0.02-0.04ppm) las cuales alcanzan los tubérculos (Bruin *et al.*, 1982).

3.2.- Pruebas para determinar la sensibilidad.

La sensibilidad de *P. infestans* a metalaxyl se puede determinar por los siguientes métodos: discos foliares, hojas desprendidas, plantas completas de papa e *in vitro* al medir el crecimiento radial el micelio en medio de centeno-agar con fungicida a diferentes concentraciones (Sozzi y Staub, 1987).

El método más ampliamente usado para determinar la sensibilidad a metalaxyl esta basado sobre la intensidad de esporulación del patógeno en discos foliares que se colocan sobre una suspensión del fungicida a diferentes concentraciones, entre 0.01 y 100 $\mu\text{g i. a. ml}^{-1}$ (Schwinn y Sozzi, 1982; Sozzi y Staub, 1987; Sozzi *et al.*, 1992). Este método es recomendado por el Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas (FRAC, por sus siglas en inglés) y es adaptado para pruebas grandes de muestras compuestas (suspensión de esporangios de muestras de campo), sin la necesidad de transferir o purificar el hongo. Un inconveniente de este método es que el fungicida debe estar en grado técnico puro para prevenir que los discos foliares se hundan en la solución debido a los agentes humectantes de la formulación.

Por otra parte, varios investigadores han usado la medida del crecimiento micelial lineal en medio de agar (centeno, jugo V8) con fungicida para determinar la respuesta a metalaxyl y en este caso sí se puede usar el fungicida formulado (Shattock, 1988; Dagget *et al.*, 1993; Therrien *et al.*, 1993; Drenth *et al.*, 1993 y 1995; Matuszak *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1994; Chycoski y Punja, 1996; Goodwin *et al.*, 1996). Para llevar a cabo esta prueba, el inóculo consiste de discos de agar con micelio (5mm de diámetro) del margen de avance de crecimiento activo de las colonias de 10-20 días. Estos discos se colocan en medio con o sin metalaxyl a una concentración entre 0.001 y 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ o mayores, y se incuban temperatura de 18-21°C bajo oscuridad. El crecimiento micelial generalmente se mide después de 6 a 7 días, o más para aquellos aislamientos de crecimiento lento, o bien hasta que la colonia en ausencia de metalaxyl alcance de 2.5 a 3 cm de diámetro.

Algunos autores, como Matuszak *et al.* (1994) y Goodwin *et al.* (1996) encontraron resultados equivalentes al usar este método en comparación al método de discos foliares.

La respuesta de crecimiento *in vitro* para cada aislamiento se calcula como porcentaje de crecimiento, al medir el diámetro de la colonia en medio con fungicida y en medio sin fungicida después de substraer a ambos el diámetro del disco de agar. Con estos datos se pueden calcular dos tipos de parámetros:

1).- La concentración efectiva de metalaxyl para inhibir el 50% del crecimiento micelial de un aislamiento (CE_{50}), calculada en base a una regresión lineal de la respuesta

(media del porcentaje de inhibición) contra la dosis (logaritmo de la concentración del fungicida).

2).- Clases de respuesta para clasificar a los aislamientos como: resistentes a metalaxyl (RM), intermedios (IM) o sensibles (SM), que varía de acuerdo al autor. Así, Shattock (1988), basándose en el porcentaje de crecimiento en presencia de $10\mu\text{g}$ de metalaxyl ml^{-1} , en relación al testigo libre de metalaxyl, clasifica a los aislamientos como RM, IM, o SM si muestran $>60\%$, $10-60\%$, ó $<10\%$ de crecimiento, respectivamente. En cambio, Dagget *et al.* (1993) y Therrien *et al.* (1993) proponen la siguiente clasificación: sensible (S= crecimiento relativo a 5 y $100\mu\text{g l}^{-1}$, menor de 40% respecto al testigo), intermedio (I= crecimiento relativo a $5\mu\text{g l}^{-1}$, $>40\%$ del testigo, pero a $100\mu\text{g l}^{-1}$ $<40\%$) y resistente (R= crecimiento relativo a 5 y $100\mu\text{g l}^{-1}$ si crecen más de 40% respecto al testigo). Por su parte, Goodwin *et al.* (1996) consideran como aislamientos sensibles (S) aquellos que crecen menos del 40% del testigo en medio con $5\mu\text{g ml}^{-1}$ y resistentes si crecen más de 40% del testigo, ya que esta concentración del fungicida proporcionó una excelente resolución de aislamientos resistentes y sensibles en estudios previos (Dagget *et al.*, 1993; Koh *et al.*, 1994; Matuszak *et al.*, 1994). En tanto que, Chycoski y Punja (1996) consideran a un aislamiento insensible (I) si la proporción de crecimiento a $50\mu\text{g ml}^{-1}$ es mayor de 0.3, esto es, si un aislamiento crece 30% respecto al testigo en medio con metalaxyl a $50\mu\text{g ml}^{-1}$, y sensible (S), si la proporción de crecimiento es ≤ 0.3 .

3.3.- Resistencia a metalaxyl.

Delp y Dekker (1985) definen el concepto de resistencia a fungicidas como una adaptación estable y hereditaria de un hongo a un fungicida, que da como resultado una menor sensibilidad a dicho producto. Por su parte, Ortiz (1989) establece que la resistencia a un fungicida es la disminución o pérdida de la capacidad de dicho producto para controlar una enfermedad fungosa que originalmente controlaba; aún cuando haya sido correctamente aplicado.

Desde su descubrimiento en 1977, el metalaxyl ha contribuido para el control efectivo de enfermedades causadas por Peronosporales en general y de *P. infestans* en particular. Sin embargo, en 1979, dos años después de su introducción en algunos países se

colectaron los primeros aislamientos resistentes de *Pseudoperonospora cubensis* de pepino cultivado en Israel (Reuveni *et al.*, 1980).

En 1980, se detectaron los primeros aislamientos de *P. infestans* resistentes a metalaxyl en campos comerciales de papa en Holanda (Davidse *et al.*, 1981), en Suiza (Staub y Sozzi, 1981) y en Irlanda (Dowley y O'Sullivan, 1981, citado por Gisi y Cohen, 1996). A partir de este año, se han reportado fenotipos resistentes entre varias poblaciones de *P. infestans* en: Israel (Cohen y Reuveni, 1983), Escocia (Holmes y Channon, 1984), Grecia (Pappas, 1985), Inglaterra (Shattock *et al.*, 1990), Estados Unidos (Deahl *et al.*, 1991), Polonia (Therrien *et al.*, 1993), Alemania (Dagget *et al.*, 1993), Corea del Sur (Young *et al.*, 1994).

En México, Matuszak *et al.* (1994) detectaron aislamientos de *P. infestans* sensibles e insensibles a metalaxyl *in vitro* colectados en siete localidades en los estados de Chiapas, Coahuila, México (Valle de Toluca), Puebla, Veracruz y Sinaloa. Los aislamientos insensibles fueron más frecuentes que los sensibles en todos los lugares; aunque en el Edo. de México, la variación en sensibilidad fue alta, en cambio en Sinaloa la frecuencia de sensibilidad a metalaxyl fue muy baja. Por su parte, Deahl *et al.* (1995) determinaron la sensibilidad de 111 aislamientos de *P. infestans in vitro* (centeno-agar) colectados en dos lugares de México: de Chapingo 47/48 fueron resistentes (MR) o intermedios (IM) y sólo 1/48 fue sensible (SM); las muestras de Toluca presentaron una mayor proporción de aislamientos sensibles o intermedios, 16/63 fueron SM y 39/63 IM. De estos sitios el 63% y 77% de los aislamientos fueron resistentes a metalaxyl y del grupo de compatibilidad A2, respectivamente. También encontraron una mayor frecuencia de resistencia a metalaxyl en los aislamientos A2 que en los A1 de Florida y Texas; sin embargo, encontraron niveles de resistencia más altos en los aislamientos A1 de California, donde no se obtuvieron aislamientos A2.

Por otra parte, Gisi y Cohen (1996), indican que no existe correlación entre los niveles de resistencia a metalaxyl y la proporción de ambos grupos de compatibilidad. Asimismo, no se ha detectado correlación entre resistencia y estructura de razas. En la población de *P. infestans* en Suiza en 1994, la proporción de aislamientos resistentes a

fungicidas fenilamidas fue más baja en razas altamente complejas (7-8 genes de virulencia) que en las razas menos complejas (5-6 genes).

Respecto al origen de la resistencia a fungicidas fenilamidas, Gisi y Cohen (1996), mencionan que en la naturaleza existen aislamientos resistentes (insensibles) en una proporción muy baja en la población aún antes de cualquier exposición al fungicida. Dagget *et al.* (1993) reportaron la existencia de aislamientos resistentes a metalaxyl colectados en 1977 en el norte de Berlín, antes de la aplicación comercial del fungicida en Alemania. Tales aislamientos resistentes preexistentes son producto de mutación en la ausencia de fungicidas fenilamidas; la frecuencia de mutación no es alterada por la aplicación de estos fungicidas. Sin embargo, el uso de fungicidas fenilamidas resulta en la selección e incremento de la frecuencia de individuos resistentes hasta que una subpoblación distinta se convierte en un factor importante en la epidemia.

También en otros patógenos se han detectado aislamientos resistentes a metalaxyl, tal como lo citan Cohen y Gisi (1996): *Plasmopara viticola* en vid en Francia (Moreau *et al.*, 1987), *Bremia lactucae* en lechuga (Crute, 1987; Morton y Urech, 1988), *Pythium spp.* en césped (Sanders, 1984) y *Peronospora tabacina* en tabaco (Bruck *et al.*, 1982).

3.4.- Medida de la resistencia.

Los parámetros más frecuentemente usados para la comparación de aislamientos resistentes y sensibles son la concentración mínima inhibitoria (MIC: concentración más baja que proporciona una inhibición completa) y las concentraciones que inhiben el 50% (CE₅₀) o el 95% (CE₉₅) de la población del patógeno (Dekker, 1987).

El reconocimiento de aislamientos resistentes a un fungicida debe hacerse por comparación con un aislamiento sensible (población del patógeno tipo silvestre). Por lo tanto, esto es necesario para obtener los datos de la línea base de sensibilidad del hongo al fungicida. La línea de regresión concentración-respuesta del patógeno tipo silvestre se compara con la línea de los aislamientos a probar. Estos datos usualmente se obtienen en experimentos con un rango de concentraciones y se expresan como CE₅₀. Esta puede variar dependiendo del método de prueba, el inóculo usado y las condiciones ambientales. Por lo

tanto, es aconsejable incluir un aislamiento de referencia conocido como sensible, en todos los experimentos de monitoreo de la resistencia (Schwinn y Sozzi, 1982).

Los niveles de la CE_{50} para metalaxyl encontrados en poblaciones de *P. infestans* sensibles, dependiendo del método de prueba son: agar (≤ 0.01 ppm), discos foliares (≤ 0.01 ppm), hojas desprendidas (0.02-2ppm) y en plantas pequeñas (0.2-0.5ppm) (Schwinn y Sozzi, 1982). Por otra parte, Sozzi *et al.* (1992), mencionan que para metalaxyl los niveles CE_{50} de aislamientos sensibles de *P. infestans* están en el rango de 0.001-0.01mg l^{-1} , mientras que los aislamientos resistentes tienen valores de $CE_{50} > 10$ mg l^{-1} . Esto permite simplificar la prueba y sólo una concentración discriminativa de metalaxyl, por ejemplo, 10mg l^{-1} , debe usarse para una determinación rápida de sensibilidad. El factor de resistencia ($FR = CE$ del aislamiento de campo/ CE del aislamiento de referencia sensible) para metalaxyl es mayor de 1000.

III.- MATERIALES Y METODOS.

1.- Colecta de material de papa infectado por *Phytophthora infestans*.

Durante los meses de agosto y septiembre de 1996 se colectaron muestras de hojas y tallos de plantas de papa con síntomas de tizón tardío de parcelas comerciales en los estados de México (Valle de Toluca) y Tlaxcala. Los sitios de colecta en el Edo. de México fueron: San Juan de las Huertas, Mpio. de Zinacantepec y Pueblo Nuevo, Mpio. de San Felipe del Progreso. En Tlaxcala, Villarreal, Mpio. de Terrenate.

Una muestra consistió de hojas o tallos con lesiones causadas por tizón tardío de sólo una planta, colectándose de 3 a 4 muestras por parcela de puntos separados. Asimismo, las parcelas estaban distantes unas de otras. Las muestras de material enfermo se colocaron en bolsas de plástico con su respectiva identificación en cuanto a localidad, fecha y variedad de papa y se trasladaron al Laboratorio de Micología del Depto. de Parasitología Agrícola de la UACH, para su procesamiento.

2.- Obtención de los aislamientos.

Las muestras colectadas se procesaron el mismo día de su colecta. El aislamiento del hongo se realizó cortando secciones de tejido de los márgenes de una sola lesión. El tejido infectado se desinfestó con hipoclorito de sodio al 1% por 90 segundos, después se enjuago en agua destilada estéril, luego se colocó sobre papel filtro estéril para secar, o bien sólo se desinfestó con hipoclorito de sodio y finalmente se transfirieron cuatro trozos de tejido a cajas Petri con medio de cultivo de avena-agar con antibióticos (pimaricina 100ppm, ampicilina 200ppm y vancomicina 200ppm) bajo condiciones asépticas. Las cajas Petri se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente (22-24°C) por 15 a 20 días y entonces se examinaron bajo el microscopio para verificar si se había aislado *P. infestans*. Después se hicieron subcultivos (transferencia de trozos de medio con micelio) sobre medio fresco de avena-agar con los antibióticos señalados y se incubaron por 2 a 3 semanas, tiempo en el cual se hizo una tercera o más transferencia en caso de que el aislamiento estuviese contaminado por hongos o bacterias. Finalmente se transfirieron trozos de agar conteniendo

cada uno de los aislamientos del hongo a medio de centeno-agar sin antibióticos para iniciar cultivos puros, ya que en este medio el hongo creció más acelerado.

Algunos aislamientos que crecieron muy lentamente en avena-agar se transfirieron a matraces de 125ml con una capa de chícharos verdes esterilizados y se incubaron a temperatura ambiente por 10 a 15 días. Una vez que se observó el crecimiento micelial, se transfirieron a centeno-agar para lograr un cultivo puro.

2.1.- Medios de cultivo.

a).- Avena-agar.

Ingredientes.

Avena.....	60g.
Extracto de levadura.....	2g.
Agar.....	15g.
Agua destilada.....	1000ml.

Preparación.

En un vaso de precipitado con 500ml de agua destilada se remojaron 60g de avena durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se filtró a través de manta de cielo. Para clarificar la solución colada, se centrifugó durante 15 minutos a 3000rpm.

En otro matraz se disolvió el agar en 500ml de agua destilada, y se adicionó el extracto de levadura y luego se le añadió el sobrenadante de avena. Finalmente la mezcla se aforó a un litro y se esterilizó por 15 minutos a 15lb/pulg².

b).- Centeno-agar (Caten y Jinkis, 1968; Deahl *et al.*, 1993 y 1995).

Ingredientes.

Centeno.....	100g.
Agar.....	15g.
Agua destilada.....	1000ml.

Preparación.

En un matraz con 500ml de agua destilada se dejaron remojando 100g de centeno durante una noche, después se cocieron al vapor durante 25 minutos. La infusión se filtró a través de tamices de 100 y 325 mallas y luego se centrifugó por 15 minutos a 3000rpm.

En otro matraz se disolvió el agar en 500ml de agua destilada y se añadió el sobrenadante de centeno, se mezcló y se aforó a un litro con agua destilada. La mezcla se esterilizó por 15 minutos a 15lb/pulg².

c).- Chicharo-agar.

Ingredientes.

Chicharos verdes.....50g.

Agar.....15g.

Agua destilada.....1000ml.

Preparación.

En 500ml de agua destilada los chicharos se cocieron al vapor por 20 minutos. La infusión se filtró en tamices de 100 y 325 mallas. O bien los chicharos únicamente se pueden moler y filtrarse.

En otro matraz se disolvió el agar en 500ml de agua destilada y se añadió el sobrenadante, se mezcló y se aforó a un litro con agua destilada y finalmente se esterilizó a 15lb/pulg² por 15 minutos.

2.2.- Identificación de los aislamientos.

Los aislamientos del hongo se identificaron con el año de colecta, seguido por un número consecutivo a partir del número 1 y seguido por dos letras que indican el lugar de colecta. Así, los aislamientos provenientes de Villarreal, Mpio. de Terrenate, Tlaxcala, se identifican como 9601VT, 9602VT, ...; los aislamientos de San Juan de las Huertas, Mpio. de Zinacantepec, Edo. de Méx., se identifican como 9601SJ, 9602SJ, ...; y los aislamientos de Pueblo Nuevo, Mpio. de San Felipe del Progreso, Edo. de Méx., como 9601PN, 9602PN, ... La fecha de colecta de los aislamientos en cada sitio fue: 28 de agosto, 6 de septiembre y 12 de septiembre de 1996, respectivamente.

2.3.- Mantenimiento de los aislamientos.

Los aislamientos de *P. infestans* se mantuvieron en medio de centeno-agar a temperatura ambiente, con transferencias periódicas cada 25 a 30 días a medio fresco.

Para la conservación a largo plazo los aislamientos se mantuvieron en centeno-agar cubiertos con aceite mineral estéril.

3.- Determinación de grupos de compatibilidad.

Para llevar a cabo esta prueba, arbitrariamente y al azar se seleccionó un aislamiento como del grupo de compatibilidad A1 de todos los colectados, que correspondió al aislamiento 9613VT, el cual sirvió como aislamiento de referencia para aparearlo con los aislamientos restantes y así conocer a qué grupo de compatibilidad correspondían (A1 ó A2) según la reacción (S. Romero, 1996, comunicación personal).

Establecido lo anterior, el grupo de compatibilidad de cada aislamiento se determinó realizando el apareamiento como sigue: en una caja Petri con medio de centeno-agar se colocó en uno de sus extremos un disco de agar (6mm de diámetro) con micelio del aislamiento de referencia 9613VT y tomando de los márgenes del cultivo y en el otro extremo de la caja se colocó otro disco de agar con micelio del aislamiento a probar o de grupo desconocido, separados de 3 a 4cm. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente por 7 a 15 días y entonces se examinaron al microscopio para observar la formación de oosporas en la interfase de la zona de avance de las dos colonias. Los aislamientos que formaron oosporas con el aislamiento 9613VT (A1) fueron clasificados como del grupo A2, y los aislamientos que no formaron oosporas fueron clasificados como A1. Los apareamientos se repitieron de 2 a 3 veces para cada aislamiento.

Para confirmar la determinación de grupo de compatibilidad se seleccionó otro aislamiento que reaccionó como A2 para aparearse con todos los demás aislamientos y observar la reacción por la formación o no de oosporas.

Para algunos aislamientos también se probó el medio de chícharo-agar.

4.- Determinación de razas fisiológicas.

La virulencia específica de cada aislamiento se determinó usando folíolos desprendidos. Los clohes de papa del juego internacional de diferenciales para *P. infestans*, conteniendo los genes de resistencia específica a una raza R1, R2, R3, R4, R6 y R7 (para algunos aislamientos también se usó R10) y algunas combinaciones como R1R2, R1R3, R2R3 y R2R4 fueron proporcionadas por el Dr. Hector Lozoya Saldaña del Programa Internacional Cooperativo del Tizón Tardío de la Papa (PICTIPAPA).

Los tubérculos de cada una de las diferenciales se sembraron en macetas de plástico de 30 cm de diámetro en un sustrato de peat-moss y se desarrollaron en el invernadero.

Se colectaron foliolos de la parte media de la planta de cada clon diferencial de 6-8 semanas de edad. Los foliolos se colocaron sobre papel filtro estéril húmedo en cajas Petri para acondicionar una cámara húmeda.

Las suspensiones de esporangios de los aislamientos a probar se prepararon de cultivos en medio de chícharo-agar contenido en tubos de ensaye o cajas Petri de 12-14 días de edad (algunos aislamientos se cultivaron en centeno-agar) por lavado con 5ml de agua destilada estéril. La suspensión se vertió en cajas Petri de plástico de 5cm de diámetro, la cual provenía de sólo un cultivo de una caja Petri o del cultivo en un tubo de ensaye. Las cajas con esporangios se incubaron a una temperatura de 10-12°C por 1 ½ a 2 horas para inducir la liberación de zoosporas.

Los foliolos se inocularon con dos motitas de algodón humedecidas en la suspensión de zoosporas, una a cada lado de la nervadura central y se incubaron por 5 a 6 días a temperatura ambiente (22-24°C) y con 12 horas luz, colocando las cajas Petri sobre las mesas del laboratorio. Para cada aislamiento, se inocularon de 2 a 3 foliolos de cada diferencial, además de la variedad susceptible Alpha, como testigo.

La interacción entre el hongo y los genotipos de papa se registraron después de 4 a 6 días de incubación, observando la ocurrencia de lesiones de tizón en los foliolos. Si se observó esporulación la interacción se registró como compatible (definida como la habilidad de un aislamiento para producir lesiones grandes y con esporulación profusa o abundante); en contraste incompatible, si no se observó esporulación o ausencia de reacción visible.

5.- Sensibilidad a metalaxyl *in vitro*.

La respuesta de crecimiento *in vitro* de cada aislamiento a metalaxyl se determinó por la comparación del crecimiento micelial radial en medio de centeno-agar (preparado de la misma forma que el usado para la determinación de grupos de compatibilidad) enmendado con metalaxyl, con el crecimiento de un testigo sin fungicida. El metalaxyl en la formulación comercial de RIDOMIL® 2E (25.1% de ingrediente activo equivalente a 240 g i. a. l⁻¹) se

adicionó a las porciones de medio de centeno-agar antes de esterilizarse (15 minutos a 15lb/pulg²) para obtener concentraciones finales de 0.01 a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, las cuales se prepararon a partir de una solución madre y diluciones en base 10. Para cada prueba, el inóculo consistió de discos de agar con micelio (6mm de diámetro) cortados del margen de avance de crecimiento activo de cultivos de 10-12 días de edad. Se colocó un disco de agar en el centro de una caja Petri con medio para las concentraciones $<1 \mu\text{g ml}^{-1}$, o bien, se colocaron tres discos en forma equidistante para concentraciones $\geq 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ en medio con o sin metalaxyl, enseguida se incubaron a temperatura ambiente bajo oscuridad. Se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento (concentración).

Para el caso de los aislamientos 9603PN (A2) y 9607PN (A1) primeramente se obtuvo la ventana biológica, esto es, determinar la concentración más alta que permite crecer casi el 100% y la más baja que inhibe casi el 100% del crecimiento micelial del hongo con respecto a un testigo sin fungicida. Una vez encontradas estas, dentro de cada concentración evaluada se agregó un mayor número en donde se suponía que se encontraba la CE_{50} (concentración que inhibe el 50% del crecimiento radial del hongo con respecto al testigo sin fungicida). Se realizaron 6 repeticiones para cada tratamiento. Las concentraciones evaluadas para obtener la CE_{50} para cada uno de los aislamientos estuvo en el rango de 0.0 a 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y se presentan en los cuadros 3 y 4, respectivamente.

La sensibilidad a metalaxyl se registró después de 6 a 7 días de incubación, cuando las colonias del testigo (sin metalaxyl) alcanzaron por lo menos 30 mm de diámetro. El tamaño de la colonia se estimó tomando la media de dos medidas perpendiculares de su diámetro y se corrigieron por la resta de 6mm del diámetro del disco. La respuesta de crecimiento *in vitro* expresada como porcentaje respecto al testigo de cada aislamiento en cada concentración se calculó al dividir el diámetro promedio de la colonia en medio con metalaxyl entre el diámetro promedio de la colonia en medio sin metalaxyl y multiplicado por 100.

En las pruebas donde los aislamientos crecieron muy poco o los resultados fueron inconsistentes, éstas se repitieron.

Cuadro3.- Concentraciones de metalaxyl para calcular la CE_{50} del aislamiento 9603PN (A2) de *Phytophthora infestans*.

NUMERO	FUNGICIDA	CONCENTRACION $\mu\text{g ml}^{-1}$ CENTENO-AGAR
1	TESTIGO	0.00
2	metalaxyl	0.001
3	metalaxyl	0.01
4	metalaxyl	0.03
5	metalaxyl	0.06
6	metalaxyl	0.08
7	metalaxyl	0.10
8	metalaxyl	0.60
9	metalaxyl	1.00
10	metalaxyl	10.00
11	metalaxyl	50.00

Cuadro 4.- Concentraciones de metalaxyl para calcular la CE_{50} del aislamiento 9607PN (A1) de *Phytophthora infestans*.

NUMERO	FUNGICIDA	CONCENTRACION $\mu\text{g ml}^{-1}$ CENTENO-AGAR
1	TESTIGO	0.00
2	metalaxyl	0.01
3	metalaxyl	0.50
4	metalaxyl	1.00
5	metalaxyl	3.00
6	metalaxyl	5.00
7	metalaxyl	10.00
8	metalaxyl	25.00
9	metalaxyl	50.00
10	metalaxyl	100.00
11	metalaxyl	200.00
12	metalaxyl	300.00

Se calcularon dos tipos de parámetros para evaluar la sensibilidad a metalaxyl:

1). La concentración efectiva de metalaxyl para inhibir el 50% del crecimiento micelial de un aislamiento (CE_{50}) se calculó mediante el análisis PROBIT, el cual se basa en el uso de la regresión lineal de la respuesta (crecimiento inhibido respecto al testigo o media el porcentaje de inhibición) contra la dosis (logaritmo de la concentración del fungicida).

2). Clases de respuesta al fungicida (Goodwin *et al.*, 1996): donde los aislamientos que crecieron menos del 40%, respecto al testigo, en medio con metalaxyl a $5\mu\text{g ml}^{-1}$ se consideraron como sensibles(S), en contraste resistentes(R), ya que con esta concentración del fungicida proporcionó una resolución excelente de aislamientos resistentes y sensibles en estudios anteriores(Dagget *et al.*, 1993; Therrien *et al.*, 1993; Koh *et al.*, 1994; Matuszak *et al.*, 1994).

IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Aislamiento de *Phytophthora infestans*.

Se hicieron varias colectas de material infectado (hojas y tallos) por *P. infestans* durante los meses de agosto y septiembre de 1996 en diferentes lugares donde se cultiva papa en los estados de México, Hidalgo y Tlaxcala. De estas, se obtuvieron 37 aislamientos de tres lugares diferentes: 21 aislamientos de Villareal, Mpio. de Terrenate, Tlaxcala; sólo un aislamiento de San Juan de las Huertas, Mpio. de Zinacantepec, Edo. de México y 15 aislamientos de Pueblo Nuevo, Mpio. de San Felipe del Progreso, Edo. de Méx. (Cuadro 5). Todos los aislamientos se obtuvieron de hojas de papa variedad Alpha.

El aislamiento del hongo se logró usando los medios de centeno-agar, avena-agar, y chícharo-agar con antibióticos, principalmente pimaricina y vancomicina a una concentración de 100 a 200ppm, ya que estos medios favorecen un crecimiento micelial acelerado además de una fructificación abundante, en comparación a los medios de jugo de tomate o jugo V8-agar en los cuales no se pudo aislar al hongo. Al respecto, algunos investigadores como Shattock *et al.* (1990), Shaw (1991) y Andrivon *et al.* (1994) han observado que algunos aislamientos de *P. infestans* no crecen en medio de jugo V8-agar.

Todos los aislamientos de *P. infestans* mostraron las características típicas de la especie: micelio cenocítico; esporangióforos ramificados en simpodio compuesto, con hinchamientos en las ramas donde nacen los esporangios, de crecimiento indeterminado; esporangios ovoides a alimonados, con papila pequeña (Figura 1).

En general todos los aislamientos cubrieron con su crecimiento la caja Petri (9 cm de diámetro) en 10-12 días, con un micelio muy denso y ramificado.

En cuanto al uso de antibióticos para el aislamiento de *P. infestans*, se observó que son muy necesarios, ya que sin ellos fue muy difícil de aislar a este hongo debido a la contaminación de otros hongos o bacterias saprófitas que invaden los tejidos necrosados por *P. infestans*, y que en medio de cultivo crecen más rápido; por esta razón no se logró obtener mas aislamientos de otros lugares.

Determinación del grupo de compatibilidad.

Los datos en el Cuadro 5 muestran la reacción del apareamiento en medio de centeno-agar de los 37 aislamientos de *P. infestans* obtenidos de diferentes lugares. También se hicieron algunos apareamientos en medio de chícharo-agar. Los aislamientos que se aparearon con el aislamiento 9613VT (A1) y que formaron oosporas se clasificaron como del grupo A2 y los aislamientos que no formaron oosporas fueron clasificados como del grupo A1. Después, estos resultados se confirmaron al usar al aislamiento 9601SJ, que por su reacción se clasificó como del grupo A2 y se tomó como otro aislamiento de referencia.

La formación de oosporas se observó después de 6 a 12 días, generalmente 8 días a partir de la fecha de apareamiento y a los 3 ó 4 días después de que se mezclaron los micelios de las colonias.

Los apareamientos que no formaron oosporas después de 15 días se mantuvieron por 4 semanas más para confirmar que efectivamente no forman oosporas por ser del mismo grupo de compatibilidad ambos aislamientos. En algunos apareamientos, los aislamientos del mismo grupo de compatibilidad tendieron a repelerse en la zona de avance del micelio de las dos colonias, notándose una línea media libre de micelio entre ambas colonias. En otros apareamientos, este fenómeno no se observó claramente, lo cual ocurre con frecuencia, como lo mencionan Gallegly y Galindo (1958). Ningún aislamiento del grupo A1 ó A2 produjo oosporas en cultivo puro o cuando se apareó con otro aislamiento de su mismo grupo de compatibilidad, lo que confirma una vez más que *P. infestans* es una especie heterotálica.

Los gametangios y oosporas observados en apareamientos de aislamientos de grupo de compatibilidad opuesto mostraron las características típicas de la especie: oogonios lisos y globosos; anteridios anfiginos y oosporas lisas, de color café-rojizo, de paredes gruesas, esféricas y appleróticas (Figura 2).

El medio de centeno-agar es un buen sustrato para llevar a cabo la determinación de grupo de compatibilidad de aislamientos de *P. infestans*, ya que favorece un crecimiento vigoroso y acelerado del micelio del hongo, permitiendo una rápida mezcla o repulsión de las colonias (micelios) y como consecuencia la formación o ausencia de gametangios y oosporas. Además, en algunos apareamientos que formaron oosporas se observó la

germinación de éstas por medio de un tubo germinativo que termina en un esporangio típico de la especie (Figura 3). Algo similar se observó al usar el medio de chícharo-agar, aunque con un crecimiento del micelio muy profuso.

Cuadro 5. Lugar de colecta, grupo de compatibilidad y raza fisiológica de aislamientos de *Phytophthora infestans* de papa colectados en 1996.

AISLAMIENTO	LUGAR DE COLECTA	GRUPO DE COMPATIBILIDAD	RAZA FISIOLÓGICA ^a
9601VT	Villarreal, Tlax.	A2	1.2.3.4.6.7.10.11
9602VT	Villarreal, Tlax.	A2	1.3.7
9603VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3
9604VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6.7
9605VT	Villarreal, Tlax.	A2	ND ^b
9606VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6.7
9607VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6.10
9608VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6.7
9609VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6.7
9610VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.6.7
9611VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6.7
9612VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6.7
9613VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2
9614VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6
9615VT	Villarreal, Tlax.	A2	2.3
9616VT	Villarreal, Tlax.	A1	2.3.4.6.7
9617VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6
9618VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.6.7
9619VT	Villarreal, Tlax.	A1	1.2.3.4.7
9620VT	Villarreal, Tlax.	A2	1.2.3.4.6.7.10
9621VT	Villarreal, Tlax.	A2	1.2.3.6.7
9601SJ	S. Juan Huertas, Edo. de Méx.	A2	1.2.3.4
9601PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.3.4.6.7.10
9602PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A1	ND
9603PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.3.4
9604PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.3.4.7
9605PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.3
9606PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A1	1.2.3.4.10
9607PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A1	2.3.4.7.10
9608PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.3.4
9609PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.3.4.7
9610PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.3.4.7
9611PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A1	2.4.10
9612PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A1	1.2.3.4.7.10
9613PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.3.4.10
9614PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.3.4
9615PN	Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	A2	1.2.4

^a Determinación parcial con las diferenciales (R1,R2,R3,R4,R6,R7,R10, R1R2,R1R3,R2R3 y R2R4).

^b No determinada.

Cuando se comparó la morfología de los aislamientos del grupo de compatibilidad A1 ó A2 no hubo características específicas que fueran únicas para cualquiera de los grupos.

En los tres lugares en donde se colectaron los aislamientos se encontraron los dos grupos de compatibilidad A1 y A2 (Cuadro 5 y 6), lo cual era de esperarse ya que estos sitios se ubican en la región conocida como la Mesa Central de México, que es el área donde primero se descubrieron los dos grupos de compatibilidad y donde ha coevolucionado el patosistema *Solanum-Phytophthora infestans* (Niederhauser, 1956 y 1991; Gallegly y Galindo, 1958). El lugar con la más alta frecuencia de aislamientos del grupo A2 de 66.7% (proporción A1:A2 de 1:2) fue Pueblo Nuevo en el Mpio. de San Felipe del Progreso, Edo. de México. En cambio, en Villarreal, Tlaxcala se encontró una mayor frecuencia de aislamientos A1(71.4%) con una proporción A1:A2 de 3:1.

Cuadro 6. Grupos de compatibilidad de aislamientos de *Phytophthora infestans* de papa colectados en diferentes lugares en 1996.

LUGAR DE COLECTA	AISLAMIENTOS PROBADOS	GRUPO DE COMPATIBILIDAD				PROPORCION A1:A2
		A1	%	A2	%	
Villarreal, Tlaxcala	21	15	71.4	6	28.6	3:1
Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	15	5	33.4	10	66.7	1:2
S. Juan Huertas, Edo. de Méx.	1	0		1		-
TOTAL	37	20	54.0	17	46.0	1:1

En general, los datos del Cuadro 6 muestran que de 37 aislamientos probados, 20 aislamientos (54%) fueron del grupo de compatibilidad A1 y 17 aislamientos (46%) del grupo A2, es decir, en una proporción aproximadamente de 1:1. Estos resultados son similares a los reportados por Gallegly y Galindo (1958) y Goodwin *et al.* (1992) con aislamientos de la Mesa Central de México. Aunque, Deahl *et al.* (1995), encontraron una mayor frecuencia de aislamientos A2 (4-5 veces) que de aislamientos A1, provenientes de Chapingo y Toluca, Edo. de Méx. Por otra parte, Cohen *et al.* (1997), encontraron que la inoculación de esporangios en las proporciones A1:A2 de 1:19 ó 19:1, produjeron oosporas en forma abundante en hojas de papa o tomate.



Figuras 1-3.- *Phytophthora infestans*. 1. (A), Esporangióforo ramificado en simpodio compuesto, con hinchamientos donde nacen los esporangios (Aumento:100x). (B), Esporangios alimonados, con papila pequeña (Aumento:400x). 2. Oospora applerótica, con el anteridio anfigino (Aumento:400x). 3. Germinación de la oospora por medio de un tubo germinativo que termina en un esporangio (Aumento:100x).

Determinación de razas fisiológicas.

Las pruebas de patogenicidad (virulencia) se realizaron en 35 aislamientos de *P. infestans* de 37 colectados en tres lugares de México. La determinación que se presenta en este estudio fue parcial y tentativa debido a que las diferenciales R5, R8, R9 R10 y R11 se encontraban en estado de plántula provenientes de cultivo de tejidos al momento de realizar las pruebas. Aunque, los aislamientos se mantienen conservados en centeno-agar cubiertos con aceite mineral, para pruebas posteriores.

Se identificaron 19 razas distintas entre 35 aislamientos de *P. infestans* probados para patogenicidad (Cuadro 7). Aunque, se identificaron razas simples con 2 ó 3 genes de virulencia (6/35 ó 17%), hubo una mayor frecuencia de razas más complejas con 4 a 8 genes (29/35 ó 83%). El número promedio de genes de virulencia fue de 4.9. La raza más común fue la 1.2.3.4.6.7, identificada en 7 aislamientos y con una frecuencia de 0.2. Otras razas comunes fueron 1.2.3.4 (frecuencia=0.1142) y 1.2.3.4.7 (frecuencia=0.0857). Las otras razas se identificaron en sólo uno o dos aislamientos.

Cuadro 7.- Frecuencia relativa (f) de los genotipos de razas fisiológicas de 35 aislamientos de *Phytophthora infestans* de México, 1996.

RAZA*	LUGAR DE COLECTA							
	GLOBAL		Villarreal, Tlax.		Pueblo Nuevo, Méx.		S. J. Huertas, Méx.	
	Aislam.	f	Aislam.	f	Aislam.	f	Aislam.	f
1.2	1	0.0286	1	0.05	-	-	-	-
2.3	1	0.0286	1	0.05	-	-	-	-
1.2.3	2	0.0571	1	0.05	1	0.0714	-	-
1.2.4	1	0.0286	-	-	1	0.0714	-	-
1.3.7	1	0.0286	1	0.05	-	-	-	-
2.4.10	1	0.0286	-	-	1	0.0714	-	-
1.2.3.4	4	0.1142	-	-	3	0.2143	1	1.00
1.3.4.7	1	0.0286	-	-	1	0.0714	-	-
1.2.3.4.6	2	0.0571	2	0.10	-	-	-	-
1.2.3.4.7	3	0.0857	1	0.05	2	0.1429	-	-
1.2.3.4.10	2	0.0571	-	-	2	0.1429	-	-
1.2.3.6.7	2	0.0571	2	0.10	-	-	-	-
2.3.4.6.7	1	0.0286	1	0.05	-	-	-	-
2.3.4.7.10	1	0.0286	-	-	1	0.0714	-	-
1.2.3.4.6.7	7	0.2000	7	0.35	-	-	-	-
1.2.3.4.6.10	1	0.0286	1	0.05	-	-	-	-
1.2.3.4.7.10	1	0.0286	-	-	1	0.0714	-	-
1.2.3.4.6.7.10	2	0.0571	1	0.05	1	0.0714	-	-
1.2.3.4.6.7.10.11	1	0.0286	1	0.05	-	-	-	-
19 RAZAS	35	1.0000	20	1.00	14	1.0000	1	1.00

* Determinación parcial con las diferenciales: R1, R2, R3, R4, R6, R7, R10, R1R2, R1R3, R2R3, R2R4.

Ningún aislamiento se identificó como de raza 0, pero todos los otros genes de patogenicidad (virulencia) se pudieron identificar con las diferenciales usadas (R1, R2, R3, R4, R6, R7, R10, R11). Cabe mencionar, que solo nueve aislamientos se probaron con la diferencial R10 y todos dieron reacción compatible o positiva; de igual forma, sólo el aislamiento 9601VT se probó con la diferencial R11 y también dió reacción compatible, por lo que fue el aislamiento que presentó la raza más compleja. Esto sugiere, que los demás genes de virulencia (5, 8 y 9) también pueden estar presentes en los aislamientos probados de los diferentes lugares muestreados, los cuales se han identificado en otros estudios con aislamientos del Valle de Toluca (Rivera-Peña, 1990; Fernández, 1993). Por lo tanto, esto explica porqué la determinación de razas fue de forma parcial y tentativa. Sin embargo, la caracterización completa puede realizarse posteriormente ya que los aislamientos se conservan.

Entre los 20 aislamientos probados de Villarreal, Tlax. la raza más común fue 1.2.3.4.6.7, con una frecuencia de 0.35, seguida por las razas 1.2.3.4.6 y 1.2.3.6.7 con una frecuencia de 0.1, respectivamente. Aunque, en esta localidad se identificó la raza más compleja (1.2.3.4.6.7.10.11) correspondiente al aislamiento 9601VT. En cambio, en los 14 aislamientos de Pueblo Nuevo, Edo. de Méx. la raza más común fue 1.2.3.4, con una frecuencia de 0.21, la cual no se identificó en Villarreal, Tlax.

El único aislamiento de San Juan de las Huertas, Edo. de Méx. (9601SJ) se identificó como raza 1.2.3.4, lo cual puede indicar que en esta localidad también se encuentran razas más complejas, portando los demás genes de patogenicidad.

En forma general, analizando los aislamientos de los tres lugares (Cuadro 8), los genes de virulencia 2, 1 y 3 fueron los más frecuentes y ocurrieron en 94, 89 y 89% de los aislamientos, respectivamente, seguido por el gene 4 (80%). Los genes de virulencia 7 y 6 aparecieron en una frecuencia intermedia, en 57 y 46% de los aislamientos, respectivamente.

En los aislamientos de Villarreal, Tlax., los genes de virulencia 2, 3 y 1 fueron los más comunes, con una frecuencia de 95, 95 y 90%, respectivamente; mientras, que en los aislamientos de Pueblo Nuevo, Edo. de Méx., fueron más frecuentes los genes 2 y 4, seguidos por los genes 1 y 3 en una proporción de 93 y 86%, respectivamente. En contraste,

el gene de virulencia 6 fue el menos frecuente (0.07) identificado en sólo un aislamiento (9601PN) (Cuadro 8).

Cuadro 8.- Incidencia de los genes de virulencia en aislamientos de *Phytophthora infestans* de México, 1996.

LUGAR DE COLECTA	GENES DE VIRULENCIA					
	1	2	3	4	6	7
Villarreal, Tlax. (20 aislamientos)						
Número de aislamientos	18	19	19	14	15	14
Frecuencia relativa	0.90	0.95	0.95	0.70	0.75	0.70
Pueblo Nuevo, Edo. de Méx. (14 aislamientos)						
Número de aislamientos	12	13	12	13	1	6
Frecuencia relativa	0.86	0.93	0.86	0.93	0.07	0.43
S. Juan Huertas, Edo. de Méx. (1 aislamiento)						
Número de aislamientos	1	1	1	1	0	0
Frecuencia relativa	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
GLOBAL (35 aislamientos)						
Número de aislamientos	31	33	31	28	16	20
Frecuencia relativa	0.89	0.94	0.89	0.80	0.46	0.57

La raza 0 no se identificó en este estudio, al igual, que razas simples con sólo un gene de virulencia. Así, la mayoría de los aislamientos presentó un genotipo complejo. Por lo que al parecer ocurrieron cambios en la estructura de razas, pues en el pasado era fácil aislar razas simples (Mills y Niederhauser, 1952; Servin, 1954 y De la Fuente (1955), citados por Galindo, 1958; Graham *et al.*, 1956) y en la actualidad no son comunes (Rivera-Peña, 1990; Fernández, 1993).

El presente trabajo parece confirmar que la raza 0 no está ampliamente presente en los lugares muestreados, lo mismo señala Rivera-Peña (1990) para el Valle de Toluca. Algo similar ocurrió en países de Europa, por ejemplo, en Alemania antes de 1950, la raza 0 fue la más común y a partir de 1980 ocurrió un incremento drástico en el número y complejidad de razas en varios países de Europa (Schöber y Turkensteen, 1992; Andrivon, 1994a, Drenth *et*

al., 1996; Sujkowski *et al.*, 1996). Sin embargo, en Estados Unidos, Deahl *et al.* (1993) si encontraron aislamientos de raza 0 en el noroeste de Washington.

En México, es conocido la ocurrencia de oosporas (Smoot *et al.*, 1958; Gallegly y Galindo, 1958) y de la recombinación sexual en *P. infestans* (Romero y Erwin, 1969). Los resultados de estos últimos autores indican que a través de la reproducción sexual los caracteres de patogenicidad se segregan independientemente, en forma mendeliana. Cuando ambos grupos de compatibilidad están presentes como ocurre en la naturaleza en México y ahora en la mayoría de los países donde se cultiva papa, junto con dos o más razas fisiológicas, hay la posibilidad de que nuevas razas más complejas pueden originarse durante el ciclo de cultivo por recombinación de caracteres preexistentes.

La contribución de la reproducción sexual a la estructura y variabilidad de las poblaciones de *P. infestans* usualmente es evaluada usando medidas de desviación del equilibrio Hardy-Weinberg. La distribución de grupos de compatibilidad y las frecuencias de alelos de isozimas en la Mesa Central de México (Gallegly y Galindo, 1958; Goodwin *et al.*, 1992) son consistentes con tal equilibrio; además, la diversidad en razas, isozimas y los marcadores de polimorfismo en la longitud de los fragmentos por restricción (RFLP) es mayor que en cualquier otra población (Andrison, 1994b; Goodwin *et al.*, 1992). Esto sugiere una mayor contribución de las oosporas como inóculo en la Mesa Central de México. Al respecto, con el fin de determinar esto, Drenth y Govers (1994), inocularon hojas de papa con dos aislamientos de grupo de compatibilidad opuesto y con patrones de hibridación de ADN distintos para permitir la formación de oosporas. Estas oosporas fueron capaces de germinar y dar origen a progenie patogénica. La progenie fue resultado de reproducción sexual como lo mostró el perfil de hibridación de ADN.

Respuesta a metalaxyl *in vitro*.

La respuesta de crecimiento a metalaxyl de 36 aislamientos de *Phytophthora infestans* de 37 colectados en tres lugares de México se determinó *in vitro*, usando el medio de centeno-agar (Cuadro 9). Todos los aislamientos probados formaron una colonia mayor a 30 mm de diámetro en 6-7 días. Los resultados obtenidos con esta prueba han sido

confirmados con los obtenidos por el método de discos foliares, tal como reportan Matuszac *et al.* (1994) con aislamientos de México y Goodwin *et al.* (1996) con aislamientos de Estados Unidos y Canada, quienes además, señalan que la prueba *in vitro* ocasionalmente da resultados inconsistentes cuando los aislamientos crecen muy lentamente; sin embargo, si los aislamientos forman una colonia con un diámetro mayor de 25mm en 7-10 días, las pruebas son exactas y repetibles.

Concentración efectiva de metalaxyl (CE_{50}).

Con la prueba de sensibilidad a metalaxyl se obtuvo una marcada variación en la respuesta de *P. infestans* a metalaxyl entre los aislamientos colectados en los tres lugares, con valores de CE_{50} en el rango de 0.17 a $>100\mu\text{g ml}^{-1}$, como se observa en el Cuadro 9, los cuales son mayores a la $CE_{50} \leq 0.01\mu\text{g ml}^{-1}$ (*in vitro*) para un aislamiento de referencia sensible considerada como la línea base de sensibilidad (Schwinn y Sozzi, 1982), lo que indica una menor sensibilidad o el desarrollo de resistencia del hongo a metalaxyl, fenómeno que ha sido reportado en varios países del mundo (Davidse *et al.*, 1981; Cohen y Reuvini, 1983; Deahl *et al.*, 1991; Dagget *et al.*, 1993; entre otros), principalmente entre los aislamientos provenientes de Villarreal, Tlax. Esto se corrobora aún más, al considerar los criterios de sensibilidad propuestos por Sozzi *et al.* (1992), donde los aislamientos sensibles de *P. infestans* a metalaxyl están en el rango de 0.001 a 0.01mg l^{-1} y los aislamientos resistentes tienen valores de $CE_{50} > 10\text{mg l}^{-1}$. En base a esto, la mayoría de los aislamientos de Villarreal, Tlax. (17/18), es decir, el 81% resultaron resistentes; en cambio, de los aislamientos de Pueblo Nuevo, Edo. de Méx., sólo el aislamiento 9607PN con una $CE_{50}=11.43\mu\text{g ml}^{-1}$ fue resistente. Mientras, que el único aislamiento de San Juan de las Huertas, Edo. de Méx. (9601SJ) fue sensible ($CE_{50}=0.69\mu\text{g ml}^{-1}$). Resultados similares encontraron Matuszac *et al.* (1994) cuando determinaron la sensibilidad de 966 aislamientos a metalaxyl de nuestro país (Chiapas, Coahuila, México, Michoacán, Puebla/Veracruz y Sinaloa), detectando aislamientos sensibles e insensibles.

Cuadro 9.- Respuesta a metalaxyl y grupo de compatibilidad de aislamientos de *Phytophthora infestans* de México, 1996.

AISLAMIENTO	GRUPO DE COMPATIBILIDAD	RESPUESTA A metalaxyl <i>in vitro</i>			FACTOR DE RESISTENCIA ^b
		5 µg ml ^{-1a}	S/R ^a	CE ₅₀	
9601VT	A2	67.80	R	77.71	7771
9602VT	A2	59.35	R	22.49	2249
9603VT	A1	64.86	R	34.44	3444
9604VT	A1	80.00	R	>100	>10000
9605VT	A2	68.14	R	>100	>10000
9606VT	A1	69.48	R	7.43	743
9607VT	A1	53.06	R	5.57	557
9608VT	A1	58.57	R	26.63	2663
9609VT	A1	64.47	R	85.03	8503
9610VT	A1	57.92	R	>100	>10000
9611VT	A1	88.20	R	>100	>10000
9612VT	A1	68.65	R	>100	>10000
9613VT	A1	59.57	R	20.09	2009
9614VT	A1	68.99	R	>100	>10000
9615VT	A2	61.37	R	27.84	2784
9616VT	A1	49.99	R	6.04	604
9617VT	A1	69.04	R	>100	>10000
9618VT	A1	65.70	R	77.19	7719
9619VT	A1	70.59	R	>100	>10000
9620VT	A2	56.45	R	7.77	777
9621VT	A2	55.22	R	10.07	1007
9601SJ	A2	19.17	S	0.69	69
9601PN	A2	57.14	R	8.29	829
9602PN	A1	47.10	R	3.24	324
9603PN	A2	nd	S	0.17	17
9604PN	A2	39.68	S	1.37	137
9605PN	A2	27.76	S	0.41	41
9606PN	A1	51.04	R	7.22	722
9607PN	A1	62.97	R	11.43	1143
9608PN	A2	29.52	S	0.75	75
9609PN	A2	nd ^c	nd	nd	nd
9610PN	A2	20.76	S	0.37	37
9611PN	A1	41.11	R	8.22	822
9612PN	A1	58.97	R	4.57	457
9613PN	A2	26.66	S	0.51	51
9614PN	A2	34.48	S	0.79	79
9615PN	A2	19.67	S	0.38	38

^a Porcentaje de crecimiento en 5 µg ml⁻¹ respecto al testigo sin metalaxyl, en medio de centeno-agar, donde Sensible(S), <40% de crecimiento y Resistente(R), >40% de crecimiento.

^b El factor de resistencia (FR) se obtiene al dividir la CE₅₀ del aislamiento de campo entre la CE₅₀=0.01 µg ml⁻¹ de un aislamiento de referencia sensible (Schwinn y Sozzi, 1982).

^c nd (no determinado).

La variación en sensibilidad a metalaxyl observada entre los aislamientos de *P. infestans* los diferentes lugares puede explicarse por el uso de este fungicida para el control de este patógeno. Por ejemplo, en la localidad de Pueblo Nuevo, Mpio. de San Felipe del Progreso, Edo. de Méx., el metalaxyl ya no se aplica para el control del tizón tardío por lo menos durante los últimos ciclos de cultivo, ya que este fungicida mostró una pérdida del control de la enfermedad. Por lo que el control químico se continuó con fungicidas de contacto como los ditiocarbamatos (principalmente mancozeb) y el clorotalonil, además del fungicida sistémico cymoxanil (CURZATE®) que pertenece al grupo de las oximas-oxiacetamidas, el cual no presenta resistencia cruzada con el metalaxyl y en general con los fungicidas fenilamidas (Diriwächter *et al.*, 1987). Además, Cohen y Samoucha (1990), citados por Gisi y Cohen (1996), demostraron que la adición de cymoxanil a oxadyl y mancozeb redujo el desarrollo de resistencia más que la mezcla oxadixyl y el incremento de la subpoblación resistente casi fue nulo. En base a esto, puede suponerse que si la pérdida del control del tizón tardío por metalaxyl se debía al desarrollo de resistencia, al dejar de usar este fungicida, la población del patógeno está revirtiendo al estado de sensibilidad al no estar sujeta a la presión de selección del fungicida, esto lo observaron Davidse *et al.* (1989) en Holanda, como lo muestran los más bajos valores de CE_{50} obtenidos (Cuadro 9).

Por otra parte, es importante señalar, que en la naturaleza existen aislamientos de *P. infestans* resistentes (insensibles) en una proporción muy baja en la población aún antes de cualquier exposición al fungicida, como lo mencionan Gisi y Cohen (1996). Al respecto, Dagget *et al.* (1993) encontraron aislamientos resistentes a metalaxyl en 1977 en Alemania, antes del uso comercial del fungicida en este país. Tales aislamientos resistentes preexistentes son producto de mutación en la ausencia de fungicidas fenilamidas.

A continuación se presentan los valores de CE_{50} de dos aislamientos de grupo de compatibilidad opuesto: 9607PN (A1) y 9603PN (A2), calculados en base al uso de un mayor número de concentraciones sugerido por la ventana biológica, que es el criterio más confiable para la determinación de la CE_{50} de un aislamiento, mediante el análisis PROBIT.

De acuerdo al porcentaje de inhibición la CE_{50} del aislamiento 9607PN (A1) indica estar entre las concentraciones de 10 y $25\mu\text{g ml}^{-1}$ (Cuadro 10), notándose además crecimiento a $300\mu\text{g ml}^{-1}$ (11.1%), lo cual nos indica una menor sensibilidad de este aislamiento a metalaxyl.

Mediante el análisis PROBIT se determinó que la CE_{50} del aislamiento 9607PN (A1) fue de $11.43\mu\text{g ml}^{-1}$, la cual es mayor a la CE_{50} del aislamiento 9603PN (A2) en 67 veces. Mientras, que la CE_{50} fue de $29473.81\mu\text{g ml}^{-1}$, con límites de confianza ($\alpha=0.05$) de 11.2386-11.5637. La ecuación de regresión que expresa la relación concentración-respuesta es $Y = -0.31 + 0.48x$ (Cuadro 12).

Cuadro 10.- Respuesta de crecimiento *in vitro* del aislamiento 9607PN (A1) de *Phytophthora infestans* a metalaxyl.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION $\mu\text{g ml}^{-1}$ CENTENO-AGAR	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	0.0	0.0
2	0.01	15.3
3	0.5	25.5
4	1.0	26.9
5	3.0	31.4
6	5.0	36.9
7	10.0	43.6
8	25.0	54.7
9	50.0	58.3
10	100.0	68.6
11	200.0	75.0
12	300.0	88.9

La respuesta de aislamiento 9603PN (A2) a metalaxyl expresada como el porcentaje de inhibición se presenta en el Cuadro 11, donde la CE_{50} parece estar entre las concentraciones de 0.1 y $0.6\mu\text{g ml}^{-1}$, además se observa casi una inhibición total de 98.3% a $50\mu\text{g ml}^{-1}$.

Al analizar estos datos con el programa PROBIT, se encontró que su CE_{50} fue de $0.17\mu\text{g ml}^{-1}$ y con límites de confianza ($\alpha=0.05$) de 0.0838-0.2538. La ecuación de regresión que expresa la relación concentración-porcentaje de inhibición (dosis-respuesta) es $Y = -1.27 + 0.68x$. Mientras que la CE_{95} fue de $44.14\mu\text{g ml}^{-1}$ (Cuadro 12).

Cuadro 11.- Respuesta de crecimiento *in vitro* del aislamiento 9603PN (A2) de *Phytophthora infestans* a metalaxyl.

TRATAMIENTO	CONCENTRACION $\mu\text{g ml}^{-1}$ CENTENO-AGAR	PORCENTAJE DE INHIBICION
1	0.00	0.0
2	0.001	10.8
3	0.01	16.3
4	0.03	27.2
5	0.06	39.0
6	0.08	45.6
7	0.10	46.8
8	0.60	59.8
9	1.00	60.6
10	10.00	92.1
11	50.00	98.3

Cadro 12.- Concentraciones efectivas de metalaxyl y ecuaciones de regresión de las líneas dosis-probit para los aislamientos 9607PN (A1) y 9603PN (A2) de *Phytophthora infestans*.

AISLAMIENTO	CE ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		LIMITES DE	ECUACION DE	FACTOR DE
	CE ₅₀	CE ₉₅	CONFIANZA ^c	REGRESION	RESISTENCIA
9607PN (A1)	11.43 ^a	29473.81	11.2863-11.5637	Y= -0.31 + 0.48x	1143
9603PN (A2)	0.17 ^b	44.14	0.0838-0.2538	Y= -1.27 + 0.68x	17

^aVarianza=0.019. ^bVarianza=0.007. ^cCon $\alpha=0.05$.

El factor de resistencia (FR) de los aislamientos 9607PN (A1) y 9603PN (A2), que se obtiene de dividir el valor de la CE₅₀ del aislamiento de campo entre el valor de la CE₅₀ (=0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$) de la línea base de sensibilidad del mismo fungicida (Schwinn y Sozzi, 1982) fue de 1143 y 17x, respectivamente. Lo cual significa que para inhibir el 50% de crecimiento, el aislamiento 9607PN ocupa 1143 veces; mientras, que el aislamiento 9603PN necesita 17 veces de la concentración del aislamiento sensible. Por otra parte, al analizar los límites de confianza ($\alpha=0.05$) a nivel de la CE₅₀ de ambos aislamientos se observa claramente que no hay un traslape entre ellos, lo cual indica que las líneas son significativamente diferentes o con respuesta diferente al fungicida, tal como se muestra en el Cuadro 12.

Clases de respuesta a metalaxyl.

Los resultados de sensibilidad de los aislamientos de *P. infestans* a metalaxyl en clases de respuesta (Cuadro 9) se analizaron en base a la clasificación propuesta por Goodwin *et al.* (1996), donde el criterio de resistencia a metalaxyl fue: crecimiento a $5\mu\text{g ml}^{-1}$ mayor de 40% respecto al testigo, en contraste sensibilidad. Así, la mayoría de los aislamientos (27/36 ó 75%) de los tres lugares fueron resistentes a metalaxyl, ya que presentaron un crecimiento $>40\%$, donde el crecimiento varió de 41.11 - 88.2% (promedio de 62.01%). Mientras, que el resto de los aislamientos (9/36 ó 25%) fueron sensibles a metalaxyl, con un crecimiento entre 19.17 y 39.68% (promedio de 27.21%).

Todos los aislamientos de Villarreal, Tlax. fueron resistentes a metalaxyl, con un crecimiento promedio de 64.44% respecto al testigo y con valores de CE_{50} generalmente altos en el rango de 5.57 a $>100\mu\text{g ml}^{-1}$ (promedio de $57.54\mu\text{g ml}^{-1}$). En cambio, entre los aislamientos de Pueblo Nuevo, Mpio. de San Felipe del Progreso, Edo. de Méx., hubo una menor proporción de aislamientos resistentes (6/14 ó 43%) y 8 aislamientos (57%) fueron sensibles a metalaxyl, que corresponden a los valores más bajos de CE_{50} entre 0.17 y $1.37\mu\text{g ml}^{-1}$, generalmente menores de $1\mu\text{g ml}^{-1}$ (promedio de $0.59\mu\text{g ml}^{-1}$). Lo cual coincide con lo señalado por Koh *et al.* (1994), donde los aislamientos de la clase sensibles presentaron valores de CE_{50} de 0- $5\mu\text{g ml}^{-1}$. Cabe señalar que los aislamientos resistentes mostraron valores de CE_{50} más bajos que los de Villarreal, Tlax. en donde el aislamiento 9607PN presentó el valor más alto con una CE_{50} igual a $11.68\mu\text{g ml}^{-1}$.

El único aislamiento de San Juan de las Huertas, Mpio. de Zinacantepec, Edo. de Méx. (9601SJ) fue sensible a metalaxyl con una $\text{CE}_{50} = 0.69\mu\text{g ml}^{-1}$.

Comparación del grupo de compatibilidad, raza fisiológica y respuesta a metalaxyl.

El grupo de compatibilidad y la respuesta a metalaxyl para los 36 aislamientos colectados en los diferentes lugares se muestra en el Cuadro 13 de una forma más resumida.

Cuadro 13.- Grupo de compatibilidad y respuesta a metalaxyl de aislamientos de *Phytophthora infestans* de México, 1996.

LUGAR DE COLECTA	NUMERO DE AISLAMIENTOS	GRUPO DE COMPATIBILIDAD			
		A1		A2	
		S*	R*	S*	R*
Villarreal, Tlax.	21	0	15	0	6
Pueblo Nuevo, Edo. de Méx.	14	0	5	8	1
San Juan de las Huertas, Edo. de Méx.	1	0	0	1	0
TOTAL	35	0(0%)	20(56%)	9(25%)	6(19%)

* Sensible (S), <40% de crecimiento en $5\mu\text{g ml}^{-1}$ respecto al testigo y Resistente(R), >40% de crecimiento en $5\mu\text{g ml}^{-1}$ respecto al testigo

Todos los aislamientos de grupo de compatibilida A1 (20/36), es decir, el 56% fueron resistentes a metalaxyl. Lo mismo ocurrió entre aislamientos de cada lugar de colecta. Así, en Villarreal, Tlax. todos los aislamientos fueron resistentes, de los cuales 15 (71.4%) fueron del grupo A1; de igual forma, en Pueblo Nuevo, todos los aislamientos del grupo A1 fueron resistentes. Esto no coincide con lo reportado por Deahl *et al.* (1995), quienes determinaron la sensibilidad *in vitro* de 111 aislamientos de *P. infestans* colectados en Chapingo y Toluca, Edo. de Méx., donde el 63 y 77% de los aislamientos fueron resistentes a metalaxyl y del grupo de compatibilidad A2. Sin embargo, encontraron niveles más altos de resistencia en los aislamientos A1 de California, donde no se obtuvieron aislamientos A2. Al respecto, también Therrien *et al.* (1993), notaron una asociación significativa entre el grupo A1 y la resistencia a metalaxyl en aislamientos de Polonia.

Como se observa, los resultados encontrados por varios investigadores se contraponen, razón por la cual no se puede establecer que exista correlación entre los niveles de resistencia a metalaxyl y grupo de compatibilidad, tal como lo indican Gisi y Cohen (1996).

Respecto a la relación entre resistencia a metalaxyl y razas fisiológicas, al analizar los datos de los Cuadros 5 y 9, se observa que no existe alguna relación entre ambos caracteres, en cuanto a que los aislamientos de raza más simple y/o compleja sean más resistentes y/o sensibles, lo cual coincide con lo reportado por Gisi y Cohen (1996).

Los resultados de este estudio confirman que la resistencia de *P. infestans* a metalaxyl está ampliamente distribuida en varios lugares del país donde se cultiva papa (Matuszac *et al.*, 1994; Deahl *et al.*, 1995) y en los cuales ocurren los dos grupos de compatibilidad. Por lo que hay una probabilidad alta de que ocurra o esté ocurriendo la reproducción sexual en el campo, lo que muy probablemente genera que las poblaciones de *P. infestans* segreguen para resistencia a metalaxyl. Además, los aislamientos resistentes muestran una capacidad competitiva igual ó mayor a la de los aislamientos sensibles, es decir, no difieren en cuanto a la capacidad de esporulación o en la eficiencia de infección (Kadish y Cohen, 1988). Por lo tanto, se deben implementar las estrategias para el manejo de la resistencia propuestas por FRAC (Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas), con el propósito de mantener y alargar la vida útil del metalaxyl y en general de los fungicidas sistémicos usados para el control del tizón tardío (Williams y Gisi, 1992).

V.- CONCLUSIONES.

- 1.- En los lugares de muestreo se encontraron los dos grupos de compatibilidad de *Phytophthora infestans*, en las siguientes proporciones (A1:A2): Villarreal, Tlax. (3:1) y Pueblo Nuevo, Edo. de Méx. (1:2). El único aislamiento de San Juan de las Huertas, Edo. de Méx. fue del grupo de compatibilidad A2.
- 2.- De los 37 aislamientos de *P. infestans* estudiados, 20(54%) fueron del grupo A1 y 17(46%) del grupo A2, es decir, en proporción aproximada de 1:1.
- 3.- Se identificaron todos los genes de patogenicidad de *P. infestans* con el juego de diferenciales probado (R1, R2, R3, R4, R6, R7, R10, R11, R1R2, R1R3, R2R3 y R2R4). Por lo que la determinación de razas fisiológicas fue parcial.
- 4.- Se identificaron 19 razas de 35 aislamientos de *P. infestans* con las diferenciales probadas. La raza más común fue 1.2.3.4.6.7, seguida por las razas 1.2.3.4 y 1.2.3.4.7.
- 5.-En general, los aislamientos de *P. infestans* fueron de raza compleja, por lo que, es muy posible que los genes de virulencia 5, 8 y 9 también estén presentes.
- 6.- La mayoría de los aislamientos de *P. infestans* (27/36 ó 75%) fueron resistentes a metalaxyl. De éstos, todos los aislamientos del grupo A1 (20) fueron resistentes.

VI.- BIBLIOGRAFÍA.

- Agrios, N. G. 1994. Fitopatología. Traducción al español de la 3ª edición en inglés. Limusa. México. D. F. pp. 317-323.
- Al-Kherb, S. M., C. Finina, R. C. Shattock, and S. Shaw 1995. The inheritance of virulence of *Phytophthora infestans* to potato. Plant Pathol. 44(3): 552-562.
- Alonso, F. 1996. El cultivo de la patata. Mundi-Prensa. Madrid. pp.13-21, 23-29.
- Andrison, D. 1994a. Races of *Phytophthora infestans* in France, 1991-1993. Potato Res. 37(3): 279-286.
- Andrison, D. 1994b. Race structure and dynamics in populations of *Phytophthora infestans*. Can. J. Bot. 72(11): 1681-1687.
- Andrison, D., C. Bease, and C. Laurent. 1994. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* collected in northwestern France from 1988 to 1993. Plant Pathol. 43(3): 471-478.
- Anónimo. 1994. Sistema producto papa. Datos básicos. SAHR. Dirección General de Política Agrícola. México, D. F. pp. 65-74.
- Beukema, H. P. and D. E. Van der Zaag. 1990. Introduction to Potato Production Pudoc Wageningen. pp. 25-31.
- Black, W., C. Mastenbroek, W. R. Mills, and L. C. Peterson. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. Euphytica 2(3): 173-179.
- Bourke, P. M. A. 1964. Emergence of potato blight, 1843-46. Nature 203(4947): 805-808.
- Caten, C. E. and J. L. Jinks. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation. Can. J. Bot. 46(4): 329-348.
- Bruck, R.I.; W.E Fry, and A. E. Apple. 1980. Effect of metalaxyl, an acylanine fungicide, on development stages of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 70(7): 597-601.
- Bruin, G. C. A., L.V. Edgington, and B. D. Ripley. 1982. Bioactivity of the fungicide metalaxyl in potato tubers after foliar sprays. Can. J. Pl. Bot. 4(4): 353-356.
- Clarke, D. D. 1983. Potato late blight: a case study. In: Biochemical Plant Pathology. J.A. Calloe (ed.). John Wiley and Sons. pp. 3-17.

Coffey, M. D. and R. Gees. 1991. The cytology of development. In: Advances in Plant Pathology. Vol. 7. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. D. S. Ingram and P. H. Williams (eds.). Academic Press. London. pp. 31-52.

Coffey, M. D. and U. E. Wilson. 1983. Histology and cytology of infection and disease caused by *Phytophthora*: Its biology, taxonomy, ecology, and pathology. C. Bartnicki-García and P. H. Tsao (eds.). APS. St. Paul, Minnesota. pp. 289-301.

Cohen, Y. and M.D. Coffey. 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes . Ann. Rev. Phytopathol. 23: 311-338.

Cohen, Y., S. Farkash, Z. Reshit, and A. Baider. 1997. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. Phytopathology 87(2): 191-196.

Cohen, Y. and M. Reuvini. 1983. Occurrence of metalaxyl-resistant of *Phytophthora infestans* in potato fields in Israel. Phytopathology 73: 925-927.

Cox, A. E. and E. C. Large. 1960. Potato blight epidemics throughout the world. U.S. Dep. Agric. Res. Surv. Handb. 174.

Chycoski, C. I. and Z. K. Punja. 1996. Characteristics of populations of *Phytophthora infestans* from potato in British Columbia and other regions of Canada during 1993 to 1995. Plant Dis. 80: 579-589.

Dagget, S.S., E. Götz, and C. D. Therrien. 1993. Phenotypic changes in populations of *Phytophthora infestans* from Eastern Germany. Phytopathology 83(3): 319-323.

Davidse, L. C., J. Henken, A. Van Dalen, A. B. K. Jespers, and B. C. Mantel. 1989. Nine years of practical experience with phenylamide resistance in *Phytophthora infestans* in the Netherlands. Neth. J. Pl. Path. 95(Suppl.1): 197-213.

Davidse, L. C., D. Looijen, L. J. Turkensteen, and D. Van der Val. 1981. Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields. Neth. J. Pl. Path. 87: 65-68.

Deahl, K. L., S. P. Demuth, S. L. Sinden, and A. Rivera-Peña. 1995. Identification of mating types and metalaxyl resistance in north american populations of *Phytophthora infestans*. Amer. Potato J. 72(1): 35-49.

Deahl, K. L., D. A. Inglis, and S. P. DeMuth. 1991. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from northwestern Washington. Amer. Potato J. 68(9): 605(abst.).

- Deahl, K. L., D. A. Inglis, and S. P. DeMuth. 1993. Testing for resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* isolates from northwestern Washington. Amer. Potato J. 70(1): 779-795.
- Dekker, J. 1987. How to detect and measure fungicide resistance. In: Experimental techniques in plant disease epidemiology. J. Kranz and J. Rotem (eds.). Berlin. pp.153-163.
- Delp, C. J. and J. D. Dekker. 1985. Fungicide resistance: definitions and use of terms. EPPO Bull. 15: 333-335.
- Diriwächter, G., D. Sozzi, C. Ney, and T. Staub. 1987. Cross-resistance in *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola* against different phenylamides and unrelated fungicides. Crop Protection 6(4): 250-255.
- Drenth, A. and F. Govers. 1994. DNA fingerprinting of the potato late blight fungus, *Phytophthora infestans*. In: Modern assays for plant pathogenic fungi: identification, detection and quantification. A. Schots, F. M.Dewey, R. CAB International. pp. 223-230.
- Drenth, A., Y. C. Q. Tas, and F. Govers. 1994. DNA fingerprinting uncovers a new sexual reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. Eur. J. Pl. Pathol. 100(2): 97-107.
- Drenth, A., L. J. Turkensteen, and F. Govers. 1993. The occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* in the Netherlands, significance and consequences. Neth. J. Pl. Pathol. 99(Suppl.): 57-67.
- Fernández E., J. 1993. Influencia del genotipo de papa en la producción de oosporas de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Friend, J. 1991. The biochemical and cell biology of interaction. In: Advances in Plant Pathology. Vol. 7. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press. London. pp. 85-129.
- Fry, W. E. and A. E. Apple. 1986. Disease management implications of age-related changes in susceptibility of potato foliage to *Phytophthora infestans*. Amer. Potato J. 63: 47-
- Fry, W. E., S. B. Goodwin, A. T. Dyer, J.M. Matuszak, A. Drenth, P. W. Tooley, L.S. Sujkowski, Y. J. Koh, B. A. Cohen, L. J. Spielman, K. L. Deahl, O. A. Inglis, and K. P. Sandlan. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and implications. Plant Dis. 77(7): 653-661.
- Fry, A., S. B. Goodwin, J. M. Matuszak, L. J. Spielman, M. G. Milgroom, and A. Drenth. 1992. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans*. Ann. Rev. Phytopathol. 30: 107-129.

- Galindo J., A. 1958. Razas fisiológicas de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. En: Primer Cong. Nac. Entom. y Fitop. ENA. Chapingo, Méx. pp. 392-398.
- Galindo A., J. and M. E. Gallegly. 1960. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 50: 123-128.
- Galindo A., J. y S. Romero C. 1958. Sexualidad en *Phytophthora infestans*. I. Grupos sexuales complementarios, oosporas en la naturaleza y heterotalismo. En: Primer Cong. Nac. Entom. y Fitop. ENA. Chapingo, Méx. pp. 412-415.
- Gallegly, M. E. 1968. Genetics of pathogenicity of *Phytophthora infestans*. *Ann. Rev. Phytopathology* 6: 375-396.
- Gallegly, M. E. and J. Galindo A. 1958. Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in nature in México. *Phytopathology* 48: 274-277.
- Gallegly, M. E. and M. E. Marvel. 1955. Inheritance of resistance to tomato race 0 of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 45: 103-109.
- Gess. R. and H. R. Hohl. 1988. Cytological comparison of specific (R3) and general resistance to late blight in potato leaf tissue. *Phytopathology* 78(3): 350-357.
- Giddins, N. J. and A. Berg. 1919. A comparison of the late blights of tomato and potato. A preliminary report. *Phytopathology* 9: 209-210.
- Gisi, U. and Y. Cohen. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: A case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Ann. Rev. Phytopathol.* 34: 549-572.
- Goodwin, S. B., L. J. Spielman, J. M. Matuszak, S. N. Bergeron, and W. E. Fry. 1992. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central México. *Phytopathology* 82: 995-961.
- Goodwin, S. B., L. S. Sujkowski, and W. E. Fry. 1996. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and Western Canada. *Phytopathology* 86(7): 793-800.
- Graham, K. H., J. S. Niederhauser, and S. Romero. 1959. Observations of races of *Phytophthora infestans* in Mexico during 1956-1957. *Amer. Potato J.* 36(6): 196-203.
- Hawkes, J. G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. In: *Potato genetics*. J. E. Bradshaw and G. R. Mackay (eds.). CAB International. pp. 3-42.

- Hohl, H. R. 1983. Nutrition of *Phytophthora*. In: *Phytophthora*: Its biology, taxonomy, ecology and pathology. D. C. Erwin, S. Bartnicki-García, and P. H. Tsao (eds.). APS. St. Paul, Minnesota. pp. 41-54.
- Hohl, H. R. 1991. Nutrition. In: *Advances in Plant Pathology*. Vol. 7. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press. London. pp. 53-84.
- Hohl, H. R. 1991. Surface-related host-pathogen interaction in *Phytophthora*. In: *Phytophthora*. J. A. Lucas, R.C. Shattock, D. S. Shaw, and L.R. Cooke (eds.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 70-89.
- Holmes, S. J. I. and A. G. Channon. 1984. Studies on metalaxyl-resistant *Phytophthora infestans* in potato crops in south-west Scotland. *Plant Pathology* 33: 347-354.
- Hooker, W. J. 1981. The potato. In: *Compendium of potato diseases*. W. J. Hooker (ed.). APS. St. Paul, Minnesota. pp. 1-5.
- Jellis, G. J. and R. E. Boulton. 1984. Damage and loss caused by potato diseases. In: *Plant diseases: infection, damage and loss*. R. K. S. Wood and G. J. Jellis (eds.). Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp. 255-266.
- Kadish, D. and Y. Cohen. 1988. Fitness of *Phytophthora infestans* isolates from metalaxyl-sensitive and resistant populations. *Phytopathology* 78(7): 912-915.
- Koh, Y. J., S. B. Goodwin, A. T. Dyer, B. A. Cohen, A. Ogoshi, N. Sato, and W. E. Fry. 1994. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian Countries. *Phytopathology* 84: 922-927.
- Laviola, C. and M. E. Gallegly. 1983. Genetic recombination and mode of inheritance of pathogenic characters by *Phytophthora infestans* through sexual reproduction. In: *Durable resistance in crops*. F. Lamberti, J. M. Waller, and N. A. Vander Graaft. (eds.). Plenum Press. New York. pp. 339-345.
- Leach, S. S. and A. E. Rich. 1969. The possible role of sexuality and cytoplasmic variation in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 59: 1360-1365.
- Malcolmson, J. F. and W. Black. 1966. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 15: 199-203.
- Matuszak, J. M., J. Fernández-Esguezabal, W. K. Gu, M. Villarreal-Gonzalez, and W. E. Fry. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* populations to metalaxyl in Mexico: distribution and dynamics. *Plant Dis.* 78: 911-916.

- Minogue, K. P. and W. E. Fry. 1981. Effect of temperature, relative humidity, and rehydration rate on germination of dried sporangia of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 71: 1181-1184.
- Mills, W. R. and J. S. Niederhauser. 1953. Observations on races of *Phytophthora infestans* in Mexico. *Phytopathology* 43(8): 454-457.
- Niederhauser, J. S. 1956. The blight, the blighter, and the blighted. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 19(1): 55-63.
- Niederhauser, S. J. 1986. Tizón tardío de la papa en México, su lugar de origen y de la solución. *Rev. Mex. Fitopatol.* 4(1): 31-36.
- Niederhauser, S. J. 1991. *Phytophthora infestans*: the Mexican connection. In: *Phytophthora*. J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw, and L. R. Cooke (eds.). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 25-45
- Niederhauser, J. S., J. Cervantes, and L. Servín. 1954. Late blight in Mexico and its implications. *Phytopathology* 44(8): 406-408.
- Oerke, E. C. 1994. Estimated crop losses due to pathogens, animal pests and weeds. In: *Crop protection: estimated losses in major food and cash crops*. A. Weber (ed.) Elsevier Science. Amsterdam. The Netherlands. pp. 450-452.
- Ortiz B., R. 1989. Manejo de la resistencia a fungicidas. Ciba-Geigy Mexicana S. A. de C. V. División Agropecuaria. México, D. F. p. 28.
- Pappas, A. C. 1985. Metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans* on greenhouse tomatoes in Greece. *Plant Pathol.* 34(2): 293-296.
- Parker, J. E., W. Knogge, and D. Scheel. 1991. Molecular aspects of host-pathogen interactions in *Phytophthora*. In: *Phytophthora*. Y. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw, and L. R. Cooke (eds.). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 90-103.
- Parlevliet, J. E. 1985. Race and pathotype concepts in parasitic fungi. *EPPO Bull.* 15(2): 145-150.
- Parlevliet, J. E. 1994. Durable resistance and how to breed for it. In: *Breeding for disease resistance with emphasis on durability*. D. L. Danial (ed.). Wageningen. The Netherlands. pp. 1-14.
- Pieterse, C. M. J., J. G. M. Pierre, D. Govers, and F. P. Govers. 1992. Molecular aspects to the potato-*Phytophthora infestans* interaction. *Nether. J. Pl. Pathol.* 98(Suppl. 2): 85-92.

Platt, H. W. 1992. Potato late blight. In: Plant disease of international importance. Vol. II. H. S. Chaube, J. Kumar, A. N. Mukhopadhyay, and U. S. Singh (eds.). Prentice Hall. New Jersey. pp. 93-123.

Reuvini, M., H. Eyal, and Y. Cohen. 1980. Development of resistance to metalaxyl in *Pseudoperonospora cubensis*. Plant Dis. 64: 1108-1109.

Rivera-Peña. 1990. Wild tuber-bearing species of *Solanum* and incidence of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary on the western slopes of the volcano Nevado de Toluca. 3. Physiological races of *Phytophthora infestans*. Potato Res. 86: 249-260.

Robertson, N. F. 1991. The challenge of *Phytophthora infestans*. In: Advances in Plant Pathology. Vol. 7. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press. London. pp. 1-30.

Roelfs, A. P., R. P. Singh, and E. E. Saari. 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. CIMMYT. México. D. F. pp. 81.

Romero C., S. 1988. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección de Patronato Universitario. Chapingo, Méx. pp. 74-78.

Romero C., S. and D. C. Erwin. 1969. Variation in pathogenicity among single-oospore cultures of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 59(9): 1310-1317.

Rotem, J., J. Kranz, and E. Sashi. 1983. Measurement of healthy and diseased haulm area for assessing late blight epidemics in potatoes. Plant Pathol. 32: 109-

Rowe, C. R. 1993. Potato health management: A holistic approach. In: Potato health management. R. C. Rowe (ed.). APS Press. St. Paul, Minnesota. pp. 3-10.

Schöber, B. and L. J. Turkensteen. 1992. Recent and future developments in potato fungal pathology. Neth. J. Pl. Pathol. 98 (Suppl. 2): 73-83.

Schwinn, F. J. and P. Margot. 1991. Control with chemicals. In: Advances in Plant Pathology Vol. 7. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press. London. pp. 225-265.

Schwinn, F. J. and D. Sozzi. 1982. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of plant pathogens to fungicides. Method for fungicide resistance in late blight of potato. FAO Plant Protec. Bull. 30(2): 69-71.

Shattock, R. C. 1988. Studies on the inheritance of resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans*. Plant Pathology 37: 4-11.

Shattock, R. C., B. D. Janssen, R. Whitbread, and D. S. Shaw. 1977. An interpretation of the frequencies of host specific phenotypes of *Phytophthora infestans* in north Wales. Ann. Appl. Biol. 86: 249-260.

Shattock, R. C., D. S. Shaw, A. M. Fyfe, J. R. Dunn, K. H. Loney, and J. A. Shattock. 1990. Phenotypes of *Phytophthora infestans* collected in England and Wales from 1985 to 1988: mating type, response to metalaxyl and isoenzyme analysis. Plant Pathol. 39: 242-248.

Shaw, D. S. 1987. The breeding system of *Phytophthora infestans*: the role A2 mating type. In: Genetics and plant pathogenesis. P. R. Day and G. J. Jellis (eds.). Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.161-174.

Shaw, D. S. 1990. The comparative genetics of *Phytophthora*. EPPO Bull. 20(1): 67-76.

Shaw, D. S. 1991. Genetics. In: Advances in Plant Pathology. Vol. 7. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press. London. pp.131-170.

Smoot, J. J., F. J. Gough, H. A. Lamey, J.J. Eichenmuller, and M.E. Gallegly. 1958. Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. Phytopathology 48(3): 165-171.

Sozzi, D., F. J. Schwinn, and U. Gisi. 1992. Determination of the sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamides: a leaf disc method. EPPO Bull. 22: 306-309.

Sozzi, D. and T. Staub. 1987. Accuracy of methods to monitor sensitivity of *Phytophthora infestans* to phenylamide fungicides. Plant Dis. 71(5): 422-425.

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

Spielman, L. J., B. J. McMaster, and W. E. Fry. 1989. Dominance and recessiveness at loci for virulence against potato and tomato in *Phytophthora infestans*. Phytopathology 77(6): 832-838.

Spielman, L. J., J. A. Sweigard, R. C. Shattock, and E. Fry. 1990. The genetics of *Phytophthora infestans*: segregation of allozyme markers in F2 and backcross progeny and the inheritance of virulence against potato resistance genes R2 y R4 in F1 progeny. Experimental Mycol. 14(1): 57-69.

Staub, T. and D. Sozzi. 1981. First practical experiences of metalaxyl resistance. Nether. J. Pl. Pathol. 87: 245-250.

Stevenson, W. R. 1993. Management of early blight and late blight. In: Potato health management. R. C. Rowe (ed.). APS Press. St. Paul. Minnesota. pp. 141-148.

- Sujkowski, L. S., S. B. Goodwin, and W. E. Fry. 1996. Changes in specific virulence in polish population of *Phytophthora infestans*: 1985-1991. Eur. J. Pl. Pathol. 102: 555-561
- Therrien, C. D., D. L. Ritch, L. S. Sujkowski, L. J. Spielman, W. E. Fry, S. S. Dagget, J. H. Sim, P. W. Tooley. 1993. *Phytophthora infestans* in Poland from 1987-1989; nuclear DNA content, mating type distribution and response to metalaxyl. J. Phytopathol. 139: 68-80.
- Thurston, H. D. and O. Schultz. 1981. Late blight. In: Compendium of potato diseases. W. J. Hooker (ed.). pp. 40-42.
- Tooley, P. W., W. E. Fry, and M. J. Villarreal González. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. J. Hed. 76(6): 431-435.
- Tooley, P. W., J. A. Sweigard, and W. E. Fry. 1986. Fitness and virulence of *Phytophthora infestans* isolates from sexual and asexual populations. Phytopathology 76(11): 1209-1212.
- Toxopeus, H. J. 1956. Reflections on the origin of new physiologic races in *Phytophthora infestans* and the breeding for resistance in potatoes. Euphytica 5(3): 221-237.
- Tsao, P. H. 1970. Selective media for isolation of pathogenic fungi. Ann. Rev. Phytopathol. 8: 157-186.
- Turkensteen, L. J. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. In: Durability of disease resistance. Th. Jacobs and J. E. Parlevliet (eds.). Klumer Academic Publications. The Netherlands. pp. 115-124.
- Umaerus, V. and M. Umaerus. 1994. Inheritance of resistance to late blight. In: Potato genetics. J. E. Bradshaw and G. R. Mackay (eds.). CAB International. pp. 365-401.
- Valadez, L. A. 1996. Producción de hortalizas. Limusa. México, D. F. pp. 212-221.
- Vanderplank, J. E. 1984. Disease resistance in plants. Academic Press. Orlando. pp. 8-9.
- Victoria, J. I. and H. D. Thurston. 1974. Light intensity effects on lesion size caused by *Phytophthora infestans* on potato leaves. Phytopathology 64: 753-754.
- Walker, J. C. 1965. Patología vegetal. Omega. Barcelona. pp. 239-253.
- Wastie, R. L. 1991. Breeding for resistance. In: Advances in Plant Pathology. Vol. 7. *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Academic Press. London. pp. 193-224.
- Williams, R. J., and U. Gisi. 1992. Monitoring pathogen sensitivity to phenylamide fungicides: principles and interpretation. EPPO Bull. 22: 299-306.

Wilson, J. B. and M. E. Gallegly. 1955. The interrelationship of potato and tomato races in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 45: 473-476.

Zhiming, Z. 1996. Potato late blight in China. *PICTIPAPA Newsletter* # 8. 2(4): 4.

