



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES**

Área temática:

**Interacción planta-microorganismo-insecto**

**Variabilidad de poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont.) de  
Bary obtenidas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) con tizón  
tardío**

Presenta:

**Biol. María del Rosario Gregorio Cipriano**

**Como requisito para obtener el grado de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Directora:** Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavía

**Co-director:** Dr. Gerardo Rodríguez Alvarado

**Morelia, Michoacán. Agosto, 2011.**



**INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES**

# ÍNDICE

## PÁGINAS

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS                                                      | i  |
| ÍNDICE DE CUADROS                                                      | ii |
| I. RESUMEN                                                             | 1  |
| II. SUMMARY                                                            | 3  |
| III. INTRODUCCIÓN GENERAL                                              | 4  |
| III.1. ORIGEN, TAXONOMÍA Y CULTIVO DEL JITOMATE                        | 4  |
| III.2. GENERALIDADES DE <i>Phytophthora infestans</i>                  | 6  |
| III.2.1. Biología del patógeno                                         | 6  |
| III.2.2. Tizón tardío                                                  | 7  |
| III.2.3. Ciclo de la enfermedad                                        | 8  |
| III.2.4. Control                                                       | 9  |
| III.3. CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE <i>Phytophthora infestans</i> | 10 |
| III.3.1. Tipo de Compatibilidad (TC)                                   | 10 |
| III.3.2. Sensibilidad a fungicidas                                     | 11 |
| III.3.3. Genotipos isoenzimáticos                                      | 11 |
| III.3.4. Haplotipos de ADN mitocondrial (ADN-mt)                       | 12 |
| III.3.5. Otros marcadores fenotípicos y genotípicos                    |    |
| Utilizados                                                             | 14 |
| III.4. DISTRIBUCIÓN DEL PATÓGENO EN MÉXICO Y EL MUNDO                  | 15 |
| III.5. ESPECIFICIDAD DE HOSPEDERO DE <i>Phytophthora infestans</i>     | 17 |
| IV. HIPÓTESIS                                                          | 19 |
| V. OBJETIVOS                                                           | 20 |
| VI. VARIABILIDAD DE POBLACIONES DE <i>Phytophthora infestans</i>       |    |
| OBTENIDAS DE JITOMATE                                                  | 21 |
| VI.1. RESUMEN                                                          | 21 |
| VI.2. ABSTRACT                                                         | 22 |
| VI.3. INTRODUCCIÓN                                                     | 22 |
| VI.4. MATERIALES Y MÉTODOS                                             | 25 |
| VI.4.1. Obtención de aislamientos                                      | 25 |

---

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>VI.4.2.</b> Determinación del Tipo de Compatibilidad           | <b>26</b> |
| <b>VI.4.3.</b> Pruebas de Patogenicidad                           | <b>26</b> |
| <b>VI.4.4.</b> Sensibilidad a Mefenoxam                           | <b>27</b> |
| <b>VI.4.5.</b> Análisis de las isoenzimas <i>Pep</i> y <i>Gpi</i> | <b>27</b> |
| <b>VI.4.6.</b> Determinación de los haplotipos del ADN-mt         | <b>28</b> |
| <b>VI.5. RESULTADOS</b>                                           | <b>30</b> |
| <b>VI.5.1.</b> Aislamientos obtenidos                             | <b>30</b> |
| <b>VI.5.2.</b> Tipo de Compatibilidad                             | <b>30</b> |
| <b>VI.5.3.</b> Pruebas de Patogenicidad                           | <b>33</b> |
| <b>VI.5.4.</b> Sensibilidad a Mefenoxam                           | <b>34</b> |
| <b>VI.5.5.</b> Isoenzimas <i>Pep</i> y <i>Gpi</i>                 | <b>34</b> |
| <b>VI.5.6.</b> Haplotipos del ADN-mt                              | <b>36</b> |
| <b>VI.6. DISCUSIÓN</b>                                            | <b>38</b> |
| <b>VII. CONCLUSIONES</b>                                          | <b>43</b> |
| <b>VIII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES</b>                     | <b>44</b> |
| <b>IX. LITERATURA CITADA</b>                                      | <b>45</b> |
| <b>X. ANEXOS</b>                                                  | <b>56</b> |

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                             | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>FIGURA 1.</b> Representación esquemática del genoma mitocondrial de <i>P. infestans</i> .                                                                                | 12     |
| <b>FIGURA 2.</b> Representación diagramática del tamaño de los fragmentos de restricción generados por la digestión de los cuatro productos de PCR de <i>P. infestans</i> . | 13     |
| <b>FIGURA 3.</b> Localidades en donde se realizaron las colectas.                                                                                                           | 25     |
| <b>FIGURA 4.</b> Bandas obtenidas de regiones del ADN-mt mediante PCR.                                                                                                      | 29     |
| <b>FIGURA 5.</b> Cultivo de jitomate en campo infectado con tizón tardío.                                                                                                   | 30     |
| <b>FIGURA 6.</b> Esporangióforos con hinchamientos de <i>P. infestans</i> .                                                                                                 | 31     |
| <b>FIGURA 7.</b> Esporangios de <i>P. infestans</i> .                                                                                                                       | 32     |
| <b>FIGURA 8.</b> Oosporas de <i>P. infestans</i> producidas en una cruza en MCA.                                                                                            | 32     |
| <b>FIGURA 9.</b> Foliolos y fruto de jitomate inoculados con <i>P. infestans</i> aislado de jitomate.                                                                       | 33     |
| <b>FIGURA 10.</b> Foliolos y rodajas de papa inoculados con <i>P. infestans</i> aislado de jitomate.                                                                        | 34     |
| <b>FIGURA 11.</b> Patrones de bandeo observados con la digestión de los productos de PCR.                                                                                   | 37     |

## ÍNDICE DE CUADROS

|                                                                                                                                      | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Cuadro 1.</b> Localidad, tipo de cultivo y variedad de jitomate de donde fueron obtenidos los aislamientos de <i>P. infestans</i> | 31     |
| <b>Cuadro 2.</b> Tipos de compatibilidad y sensibilidad a mefenoxam de los aislamientos obtenidos                                    | 35     |
| <b>Cuadro 3.</b> Características de los aislamientos analizados en cada localidad                                                    | 36     |

## I. RESUMEN

El jitomate es uno de los cultivos de mayor importancia en el país, en Michoacán es la hortaliza con mayor superficie cultivada y la de mayor producción. Sin embargo, es afectado por el tizón tardío, una devastadora enfermedad capaz de ocasionar el 100% de destrucción de una zona productora en unos cuantos días, si las medidas de control no son implementadas a tiempo. La enfermedad es causada por el oomiceto *Phytophthora infestans*, organismo que presenta una alta variabilidad genética en lo que respecta a virulencia, agresividad y sensibilidad a fungicidas. Para que adecuadas prácticas de manejo de la enfermedad sean aplicadas, es necesario conocer la estructura y dinámica poblacional del patógeno. Existen una serie de marcadores tanto genotípicos como fenotípicos que proporcionan una amplia información sobre las características de la población o poblaciones existentes en una determinada región. Los trabajos sobre poblaciones de *P. infestans* se han enfocado principalmente a la parte central del valle de México y al cultivo de papa, siendo los estudios enfocados a otras regiones del país y al cultivo de jitomate muy escasos. El objetivo de este estudio fue llevar a cabo la caracterización de poblaciones de *P. infestans* atacando al jitomate en Michoacán, tanto en campo como en invernadero, utilizando diferentes marcadores (tipo de compatibilidad, sensibilidad al mefenoxam, genotipos isoenzimáticos y haplotipos mitocondriales). Además, se determinó si los aislamientos obtenidos eran infectivos en papa y jitomate. Asimismo, se realizaron pruebas de compatibilidad/incompatibilidad reproductiva realizando cruza entre aislamientos con tipos de compatibilidad opuestos de estos dos hospederos. En campo se obtuvieron aislamientos con los dos TC, así como organismos homotéricos, mientras que en invernadero únicamente se obtuvo el TC A2. Los aislamientos obtenidos en campo fueron más sensibles al mefenoxam mientras que los de invernadero la mayoría fueron tolerantes. Se detectaron tres genotipos dilocus para las isoenzimas *Glucosa 6-fosfato-isomerasa* y *Peptidasa*. Se detectó el haplotipo mitocondrial I-a. De acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó que los genotipos de las poblaciones que atacan tanto a los cultivos de papa como de jitomate en Michoacán son similares, ya que en ambas se lleva a cabo la

reproducción sexual y que no existe incompatibilidad ni especificidad de hospederos de *P. infestans*.

## II. SUMMARY

Tomato is one of the most important crops in Mexico, in the state of Michoacan is the horticultural crop with the largest acreage and the highest production. However, the yield of tomato is affected by the disease late blight, that could be devastating and able to cause 100% destruction on a producing area in a few days, if control measures are not implemented on time. The disease is caused by the oomycete *Phytophthora infestans*, an organism with high genetic variability in virulence, aggressiveness and sensitivity to fungicides. Knowing the structure and dynamic of the pathogen population in a given geographic region could help us to implement appropriate practices for disease management. In order to study the populations of *P. infestans*, there are several markers both genotypic and phenotypic that provide extensive information about population characteristics in a given region. The studies of *P. infestans* have focused mainly on the populations of the central valley of Mexico on potato crops being the work done on populations that affect other regions of the country and on the tomato crop scarce. The aim of this study was to characterize populations of *P. infestans* attacking tomato in Michoacan in the field as well as in greenhouse, using different markers (mating type, metalaxyl sensitivity, isozyme genotype and mitochondrial haplotypes). Also it was determined whether the isolates were infective on potato and tomato and strains with opposite mating types obtained from these two hosts were crossed to test if reproductive compatibility existed between them. Isolates with both mating types were found in the field, as well as homothallic organisms. In the greenhouse only mating type A2 was detected. Most field isolates were sensitive to mefenoxam, while in the greenhouse the majority were tolerant. Three dilocus genotypes were detected for isozyme *Glucose 6-phosphate isomerase* and *peptidase*. The mitochondrial haplotype I-a was detected. According to the results obtained, it was concluded that the populations attacking both potato and tomato crops in Michoacan are similar, in both sexual reproduction takes place and that there is no reproductive incompatibility or host specificity of *P. infestans*.

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

La horticultura en México es una de las áreas agrícolas más dinámicas y con mayor capacidad exportadora. Se producen alrededor de 70 variedades de hortalizas, entre las cuales sobresale el jitomate como la más consumida y de mayor valor económico en el mundo (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995, SIACON 2007). Sin embargo, existen enfermedades que constituyen un factor limitante en la producción de este cultivo. Se han reportado cerca de 200 patologías del jitomate con diversas causas y etiologías (Tigchelaar 1991). Dentro de las más importantes se encuentra el tizón tardío, enfermedad que es conocida por su efecto devastador en los cultivos que ataca, siendo la papa, además del jitomate las principales especies afectadas (Agrios 2005, Garry *et al.* 2005, Klarfeld *et al.* 2009). Aunque las poblaciones de *P. infestans* que afectan a la papa han sido ampliamente estudiadas en México, principalmente en el valle de Toluca, la información que existe acerca de las que atacan a jitomate es escasa. El presente trabajo se realizó con el fin de evaluar la variabilidad genética de estas poblaciones en Michoacán.

#### III.1. ORIGEN, TAXONOMÍA Y CULTIVO DEL JITOMATE

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta perteneciente a la familia Solanaceae. Las solanáceas se encuentran dentro de las Angiospermas, son una de las familias más grandes y económicamente importantes del mundo, se estima que posee 96 géneros y aproximadamente 2300 especies (D'Arcy 1991, citado por Spooner *et al.* 1993). Dentro de estas el género *Solanum* es el más importante, ya que, se calcula que consta con 1000 a 2000 especies (Bohs y Olmstead 1997, Bohs 2005). Además del jitomate existen otras especies de importancia dentro de la agricultura a nivel mundial que son: la papa (*S. tuberosum* L.) y la berenjena (*S. melongena* L.).

La palabra jitomate procede del vocablo náhuatl *xitomatl*, *xihtli* (ombligo) y *tomatl* (tomate), que significa tomate de ombligo (Medina-Ramos 1999). Los parientes silvestres del jitomate son nativos de la parte occidental de Suramérica a lo largo de

la costa y los Andes del centro de Ecuador, a través de Perú y al norte de Chile, además de las Islas Galápagos (Smith 2001, Peralta y Spooner 2007). Se cree que muy probablemente el ancestro del jitomate es el cherry silvestre (*Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* (Alef.) Fosberg) que crece espontáneamente en las regiones tropicales y subtropicales de América y se ha extendido a lo largo de los trópicos de todo el mundo (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995, Peralta y Spooner 2007).

Se considera a México y a Perú como los posibles centros de domesticación para el jitomate (Tigchelaar 1991, Esquinas-Alcázar y Nuez 1995, Smith 2001). Sin embargo, las evidencias que se han presentado para ambas hipótesis, no han sido suficientes para establecer o descartar una u otra, por lo cual, es necesaria la realización de estudios moleculares que ayuden a dar claridad a esta controversia. Se podría considerar la posibilidad de que este cultivo pudo haber sido domesticado en ambos lugares de manera independiente (Peralta y Spooner 2007).

El jitomate ha sido consumido en México desde la época prehispánica (Smith 2001). Después de la conquista los españoles difundieron este fruto por todo su imperio y por Europa, de allí se difundió a los países Asiáticos y Africanos, además a Estados Unidos y Canadá (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995, Smith 2001). En la actualidad ha adquirido importancia económica en todo el mundo, es la hortaliza más consumida en numerosos países y su demanda aumenta constantemente (Esquinas-Alcázar y Nuez 1995). Su versatilidad para consumo en fresco o en conserva y su adaptabilidad han jugado un papel fundamental en su rápida y extensa utilización (Tigchelaar 1991, Peralta y Spooner 2007).

México es el principal exportador de jitomate fresco (Foreign Agricultural Service/USDA 2009) y ocupa el décimo lugar de producción a nivel mundial; en el 2008 se produjeron más de 2.93 millones de toneladas, ocupando el sexto lugar de productos agropecuarios del país, después de la caña de azúcar, el maíz, la leche de vaca, las naranjas y el trigo (FAOSTAT 2010). En Michoacán el jitomate es la

hortaliza con mayor superficie cultivada y la de mayor producción (SIACON 2007). Se cultiva en 53 municipios con una superficie de 5,351 hectáreas y una producción de casi 200,000 toneladas anualmente (Becerra-Ibarra 2010). Es considerado como uno de los cultivos líderes en materia de generación de valor agregado, desarrollo y aplicación de tecnologías con lo que se da mayor fortaleza al sector y mejores condiciones de vida a los productores, además genera una importante número de empleos y gran derrama económica en las regiones productoras (Becerra-Ibarra 2010).

### **III.2. GENERALIDADES DE *Phytophthora infestans***

#### **III.2.1. Biología del patógeno**

El causante del tizón tardío es un organismo llamado *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, un patógeno hemibiotrófico, perteneciente al Phylum Oomycota del reino Stramenipila, dentro del cual también se encuentran las algas pardas y las diatomeas (Manfrim 2002, Kamoun y Smart 2005). El micelio de este patógeno es hialino y cenocítico con núcleo diploide, produce esporangios ovoides, elipsoides a limoniformes, semipapilados y caducos que se desarrollan sobre las puntas de esporangióforos ramificados (Erwin y Ribeiro 1996, Agrios 2005). En los sitios donde los esporangios son producidos los esporangióforos forman hinchamientos que son característicos de este oomicete (Erwin y Ribeiro 1996). Los esporangios germinan generalmente liberando zoosporas biflageladas, pero si las condiciones de temperatura varían, los esporangios pueden germinar directamente produciendo un tubo germinativo (Agrios 2005, Hardman 2009). Las zoosporas poseen dos flagelos con orientación y posición diferente, un flagelo largo con mastigonemas plumosos y uno más corto, delgado y cilíndrico, en forma de látigo (Jaramillo-Villegas 2003, Judelson y Blanco 2005).

*P. infestans* es un organismo heterotálico que presenta dos tipos de compatibilidad (TC), conocidos como TC A1 y TC A2, estos se diferencian por la producción de

diferentes tipos de hormonas, capaces de inducir la formación de gametangios del TC opuesto (Ko 1978). Cada tipo de compatibilidad o tipo de apareamiento es bisexual, capaz de producir oogonios o anteridios a partir de la diferenciación de su micelio vegetativo; la fusión entre gametangios de tipos de compatibilidad opuestos, resulta en la formación de una oospora (Galindo y Gallegly 1960, citado por Páez *et al.* 2004). La oospora puede permanecer latente en el suelo hasta la próxima siembra, ya que puede resistir condiciones desfavorables, tales como sequía, bajas temperaturas y ausencia de hospedantes (Agrios 2005, Grünwald y Flier 2005). Pueden sobrevivir en el suelo de 2 hasta 4 años (Fry *et al.* 1993, Turkenstein *et al.* 2000).

### **III.2.2. Tizón tardío**

*P. infestans* además del jitomate y la papa, tiene hospederos que incluyen un gran número de especies dentro de las solanáceas, la mayoría pertenecientes al género *Solanum*, pero también a integrantes de géneros como: *Petunia*, *Calibrachoa* y *Nicotiane* (Erwin y Ribeiro 1996, Beckett *et al.* 2006, Chacón-Acosta 2007). Los principales factores climáticos que favorecen el desarrollo y diseminación del tizón tardío son las bajas temperaturas y la alta humedad (Fry 1998, Agrios 2005).

El oomicete puede infectar al jitomate en cualquier estadio de desarrollo del cultivo (Agrios 2005). Ataca la parte aérea de las plantas, observándose la presencia de lesiones café oscuras a negras sobre folíolos, tallos y frutos, las cuales pueden ser pequeñas al principio y poseer bordes cloróticos, que se expanden rápidamente y llegan a ser necróticas (Schumann y D'Arcy 2000). Cuando la humedad relativa es mayor de 90%, los esporangios son formados sobre las superficies inferiores de las hojas y sobre los tallos y frutos afectados (Stevenson 1991, Torres 2002). La esporulación puede ocurrir entre 3 a 26 °C, pero el rango óptimo es de 18 a 22 °C. A temperaturas menores de 15 a 18 °C los esporangios germinan generalmente por liberación de zoosporas, sin embargo, a temperaturas mayores, entre 21 a 26 °C germinan directamente produciendo un tubo germinativo (Schumann y D'Arcy 2000,

Agrios 2005). Si las condiciones antes mencionadas se presentan, esta enfermedad es capaz de destruir totalmente las plantas de una zona de cultivo en tan sólo una o dos semanas y aun cuando las pérdidas en el campo sean insignificantes, los jitomates pueden ser infectados durante la cosecha y pudrirse mientras son almacenados si no se aplican métodos de control adecuados (Fry 1998, Schumann y D'Arcy 2000, Agrios 2005).

Esta enfermedad ha causado grandes daños a la producción de jitomate en diferentes partes del mundo, especialmente en los Estados Unidos en donde se han reportado numerosas epidemias que han afectado el rendimiento de dicho cultivo generando la pérdida de importantes sumas de capital (Legard *et. al.* 1995, Goodwin 1997, Wangsomboondee *et. al.* 2002, Deahl 2007). En México y particularmente en Michoacán, no existen registros oficiales sobre las pérdidas que genera la presencia del tizón tardío en jitomate, ya que, los productores utilizan grandes cantidades de fungicidas para controlar al patógeno. Generalmente los que mayores pérdidas sufren, son los pequeños agricultores que no cuentan con los medios para obtener los productos necesarios ni el asesoramiento profesional para la prevención y el manejo de la enfermedad.

### **III.2.3. Ciclo de la enfermedad**

Cuando no se lleva a cabo la reproducción sexual, el patógeno sobrevive como micelio sobre tubérculos de papa, que quedan después de la cosecha o son arrojados a los bordes del campo. Los esporangios pueden ser producidos en los tubérculos infectados o en nuevos brotes en la primavera siguiente. Las corrientes de aire transportan a los esporangios a nuevos folíolos de plantas de papa o jitomate, dentro del mismo cultivo o cultivos circundantes. Algunas veces las semillas de estas dos especies pueden estar infectadas y contribuir al inicio de un brote de tizón tardío. Unos días después de la infección, nuevos esporangios son producidos y son dispersados por el viento o por el agua a nuevas partes de la misma planta o a nuevas plantas. También pueden ser transportados por el agua a través del suelo

para infectar los tubérculos de papa. Si ambos tipos de compatibilidad se ponen en contacto, se pueden producir las oosporas que sobreviven en el suelo en residuos del cultivo. Cuando las condiciones son favorables nuevamente, las oosporas germinan produciendo esporangios (Schumann y D'Arcy 2000).

#### **III.2.4. Control**

El manejo integrado del tizón tardío mediante la aplicación de fungicidas de contacto y sistémicos, junto con prácticas sanitarias adecuadas, es la manera más común y efectiva para prevenir y controlar la enfermedad (Stevenson 1991). Adicionalmente se utilizan variedades resistentes de papa en algunos lugares. Sin embargo, estas deben mejorarse continuamente debido a que el patógeno es capaz de infectar estas variedades, por su continua y rápida evolución (Grünwald y Flier 2005, Klarfeld 2009, Widmark 2010). Los fungicidas que controlan el tizón tardío sólo son efectivos si son aplicados antes o cuando se acerca el tiempo de infección (Bodker y Nielsen 2001). Por lo cual, se han desarrollado sistemas de predicción, tales como el BLITECAST que se basan en las condiciones de temperatura, lluvia y humedad, para identificar los periodos en los que la aplicación de fungicidas será más eficiente en el control de la enfermedad, estos han sido de gran ayuda para evitar el uso excesivo de estos agroquímicos (Stevenson 1991, Hansen *et al.* 2001).

Entre las prácticas culturales para el control de la enfermedad se recomiendan la eliminación de los montículos de desecho de la plantación, así como la destrucción de plantas de papa y jitomate espontáneas, ya que cualquier material vegetal sirve como fuente de inóculo para campos de cultivo cercanos. No plantar papa cerca de jitomate o viceversa u otros cultivos pertenecientes a las solanáceas. Asegurarse de que cualquier material biológico importado de áreas con tizón tardío haya pasado por el programa de certificación y que se encuentren libres del patógeno (Stevenson 1991, Torres 2002).

Como otra alternativa, se ha demostrado el uso potencial de antagonistas microbianos de *P. infestans*, entre los que se incluyen especies de bacterias y hongos que evitan el desarrollo de la enfermedad, sobre todo en ambientes controlados o en lugares en los que las condiciones no favorecen al patógeno (Lozoya-Saldaña *et al.* 2006b).

### **III.3. CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE *Phytophthora infestans***

La caracterización de las poblaciones de *P. infestans* permite entender el comportamiento, evolución y dinámica poblacional de este patógeno en las diferentes regiones del mundo. De esta manera, se puede verificar que las prácticas de manejo y las herramientas de predicción, así como las estrategias de producción de papa y jitomate sean adecuadas para las poblaciones del patógeno contemporáneas, lo que permite mejorarlas y proporcionar soluciones prácticas al problema del tizón tardío (Fry *et al.* 1993, Cooke y Lees 2004, Jarrín 2006). Existen varios marcadores fenotípicos y genotípicos que permiten el estudio de las poblaciones de *P. infestans* (Cooke y Lees 2004).

#### **III.3.1. Tipo de Compatibilidad (TC)**

El monitoreo de la presencia de los TC A1 y A2 en una determinada localidad o región, es importante porque permite conocer si se está llevando a cabo la reproducción sexual entre las poblaciones de *P. infestans* presentes. Debido a que la reproducción sexual produce mayor variabilidad y acelera la adaptación evolutiva en una población, en los sitios donde esta se presenta, continuamente aparecen nuevas cepas del patógeno con mayor virulencia y diversidad genética, lo que resulta en nuevas y complejas razas fisiológicas (Fry *et al.* 1993, Goodwin *et al.* 1995, Agrios 2005). De esta forma la capacidad de adaptación del patógeno se incrementa y se reduce la previsibilidad del manejo de la enfermedad (Cooke y Lees 2004).

### III.3.2. Sensibilidad a fungicidas

El mefenoxam (metalaxyl-M) es un fungicida agrícola sistémico, específico para el control de oomicetos (Matheron 2001). Interfiere con la síntesis de ARN ribosomal, con lo cual evita la liberación, movimiento y germinación de zoosporas; inhibe el crecimiento micelial y formación de esporangios y haustorios secundarios en los tejidos de la planta (Matheron 2001, Torres 2002). El metalaxil inicialmente fue aplicado sólo y al igual que otras acilalaninas, al actuar sobre sitios específicos del patógeno, favorece un rápido desarrollo de resistencia (Oyarzun *et al.* 1998, Jaime-García *et al.* 2000). Esto ha dificultado el manejo de la enfermedad, en las diferentes partes del mundo donde se ha detectado (Cohen y Reuveni 1983, Matuszak *et al.* 1994, Sujkowski *et al.* 1995). Debido a que el mefenoxam es ampliamente usado para combatir el tizón tardío y a que la resistencia del patógeno a este fungicida es hereditaria, la prueba de sensibilidad se usa como un marcador para caracterizar una población (Garay-Serrano 2005).

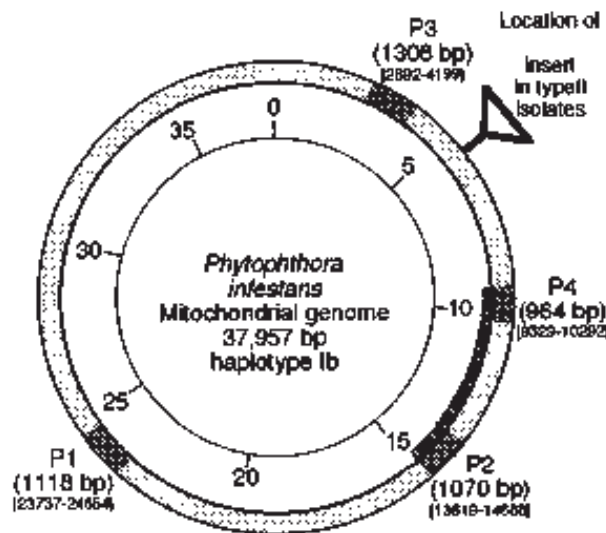
### III.3.3. Genotipos Isoenzimáticos

Una isoenzima es una variante de una enzima que comparte la misma función catalítica en el metabolismo celular. Los isoenzimas cuyas variantes son codificadas en el mismo locus son llamadas aloenzimas (Goodwin 2004, Martínez *et al.* 2010). Las isoenzimas se utilizan para identificar la diversidad de organismos dentro poblaciones y proveen evidencia genética de diploidía (Tooley *et al.* 1989, Fry *et al.* 1993, Jaramillo-Villegas 2003). Pueden detectarse y separarse mediante electroforesis sobre geles de extracto vegetal, puesto que varían en sus valores de pH isoeléctricos (Goodwin 2004, Garay-Serrano 2005). La *glucosa 6-fosfato isomerasa* (*Gpi*) y la *peptidasa* (*Pep*) son las enzimas comúnmente utilizadas en la caracterización de poblaciones de *P. infestans* por su buena resolución y polimorfismo (Tooley *et al.* 1985).

### III.3.4. Haplotipos del ADN mitocondrial (ADN-mt).

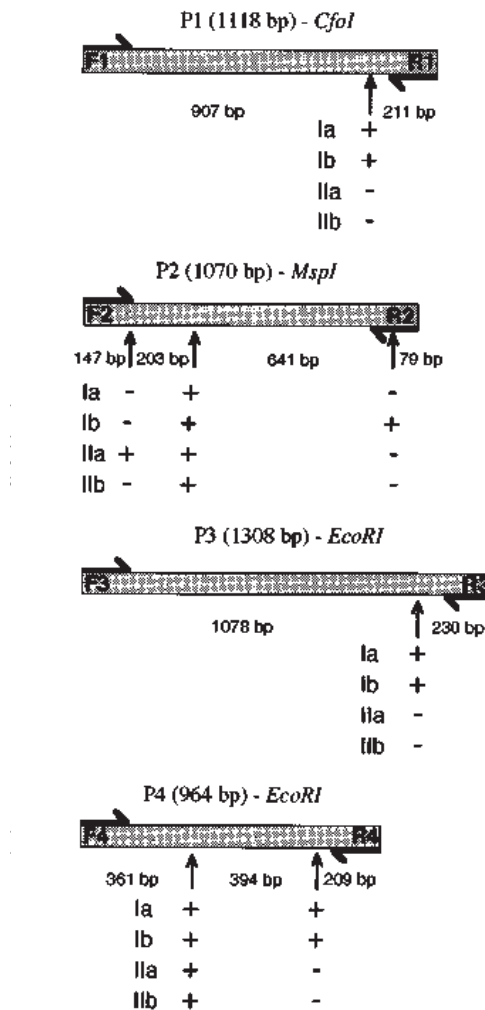
Un haplotipo es una combinación de alelos ligados a múltiples loci que se heredan juntos, se pueden referir a un solo locus, a varios loci o incluso a un cromosoma entero (Nature Education 2011). Los polimorfismos en el DNA mitocondrial de *P. infestans* son particularmente útiles para monitorear la población del patógeno; son fáciles de detectar y debido a que son de herencia uniparental, son ideales para trazar líneas de descendencia y determinar eventos de migración de un individuo (Carter *et al.* 1990, citado por May y Ristaino 2004, Griffith y Shaw 1998).

Carter *et al.* (1991) describieron cuatro haplotipos para *P. infestans*: I-a, II-a, I-b y II-b; dichos haplotipos difieren entre sí por una pequeña sustitución de nucleótidos, se encuentran distribuidos en cuatro regiones del ADN-mt que son conocidos como sitios de polimorfismo P1, P2, P3 y P4 (Fig. 1).



**Figura 1.** Representación esquemática del genoma mitocondrial de *P. infestans*. Ilustra la localización de los productos de la amplificación de los cuatro sitios de polimorfismo presentes en este patógeno (Griffith y Shaw 1998).

Se diseñaron iniciadores para la amplificación de estas cuatro regiones, los cuales después son digeridos con diferentes enzimas de restricción para diferenciar cada haplotipo (Fig. 2). Los sitios de polimorfismo P1, P3 y P4, son sitios de polimorfismo entre los haplotipos I-a/I-b y haplotipos II-a/II-b, mientras que P2 es el sitio de los polimorfismo I-a/I-b; (Griffith y Shaw 1998).



**Figura 2.** Representación diagramática del tamaño de los fragmentos de restricción generados por la digestión de los cuatro productos de PCR de *P. infestans*. Los sitios de restricción son indicados con flechas y la presencia o ausencia de estos es indicado por + o – (Griffith y Shaw 1998).

### III.3.5. Otros marcadores fenotípicos y genotípicos utilizados

La virulencia y la agresividad son otros marcadores fenotípicos comúnmente utilizados. La virulencia se determina mediante pruebas de compatibilidad/incompatibilidad de los aislamientos con una serie de plantas diferenciales que poseen diferentes genes de resistencia (Jaramillo-Villegas 2003, Cooke y Lees 2004). La agresividad se mide tomando en cuenta varios componentes que afectan la eficiencia de la infección, tales como: el tamaño de la lesión, el periodo de incubación, el periodo de latencia y la capacidad de esporulación (Suassuna *et al.* 2004). También ha sido estudiado el efecto de la temperatura sobre diferentes líneas clonales, lo cual se utiliza en los sistemas de predicción de la enfermedad (Mizubuti y Fry 1998, Hansen *et al.* 2001).

Existen otros marcadores genotípicos además de los mencionados anteriormente, que han demostrado ser importantes herramientas para monitorear la diversidad genética de *P. infestans*. La prueba de RFLP (por sus siglas en inglés, Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) utilizando el gen RG57 puede identificar individuos relacionados de manera clonal con un alto grado de acierto (Garay-Serrano 2005). Los AFLPs (por sus siglas en inglés, Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados) fueron centrales en el mapeo genético de *P. infestans* y pueden determinar la diversidad intra-poblacional (Knapova y Gisi 2002, Cooke *et al.* 2003, Flier *et al.* 2003, Mesa-Salgado 2008).

Los RAPDs (por sus siglas en inglés, Polimorfismos del ADN Amplificados al Azar), han sido utilizados para detectar variación genética de la población de *P. infestans* durante periodos de cambio rápido (Jaramillo-Villegas 2003, Páez *et al.* 2005). Las secuencias repetitivas simples (SSR) o microsatélites son otros marcadores con un gran potencial para el análisis genético de *P. infestans* (Cooke y Lees 2004). Debido a su alta variabilidad y densa distribución a través del genoma, han sido muy utilizados recientemente (Knapova y Gisi 2002, Vargas *et al.* 2009, Montarry *et al.* 2010). Las secuencias intergénicas repetitivas simples (ISSR) o inter-microsatélites

son un tipo de marcador relativamente nuevo, que está dando los más promisorios resultados para el entendimiento de este organismo con respecto a su dinámica poblacional, variabilidad y potencial para la identificación de aislados (Jarrín 2006). Los SNPs (Polimorfismos de Nucleótidos Simple) y los análisis de secuencias son otros marcadores con un alto potencial para el estudio de la variabilidad de las poblaciones de *P. infestans* (Cooke y Lees 2004).

### **III.4. DISTRIBUCIÓN DEL PATÓGENO EN MÉXICO Y EL MUNDO**

Se considera que *P. infestans* se originó en las zonas altas del centro de México, más específicamente dentro del valle de Toluca (Goodwin *et al.* 1992b, Fry *et al.* 1993, Flier *et al.* 2003, Lozoya-Saldaña *et al.* 2006a, Chacón-Acosta 2007). Actualmente se presenta en cualquier parte del mundo en la que se cultive papa y jitomate (Goodwin 1997, Fry *et al.* 2009). Esta especie es famosa a nivel mundial por haber causado la epidemia en papa que provocó una gran hambruna en Irlanda, la cual, tuvo como consecuencias la muerte y migración de millones de irlandeses entre 1845 y 1846 (Agrios 2005). Se piensa que el patógeno llegó a Europa mediante una migración a principios de 1840, primero de México a Estados Unidos y después de este país a Europa (Fry *et al.* 1993, Goodwin *et al.* 1994, Goodwin 1997). De Europa el patógeno pudo haberse distribuido al resto del mundo por medio del comercio internacional de tubérculos como semilla (Fry *et al.* 1993).

Antes de los 1980s únicamente el TC A1 se encontraba presente fuera de México, el linaje clonal predominante era el genotipo correspondiente al US-1 (que presenta: TC A1, haplotipo mitocondrial I-b, genotipo 86/100 para *Gpi* y 92/100 para *Pep*, un patrón de RFLP único y es sensible al mefenoxam) y no se tenían evidencias de que una migración adicional a la de los 1840s hubiera ocurrido. Por lo cual se llegó a la conclusión de que este linaje había sido el causante de la epidemia del tizón tardío a mediados del siglo XIX (Goodwin *et al.* 1994). Sin embargo, un estudio analizando ADN mitocondrial de especímenes de herbario demostró que el patógeno a

mediados del siglo XIX y principios del XX en Europa poseía el haplotipo I-a, a diferencia del US-1 que es I-b. Por lo que se llegó a la conclusión de que US-1 no era el linaje dominante antes de los 1950s y por lo tanto no era posible que fuera el causante de dicha epidemia (May y Ristaino 2004).

En 1981 se reportó por primera vez el TC A2 fuera de México, en Suiza y poco tiempo después en otros países europeos (Hohl y Iselin 1984; citado Fry *et al.* 2009) y estudios posteriores con diferentes marcadores moleculares (haplotipos mitocondriales, genotipos isoenzimáticos y patrones genéticos RFLP) mostraron la aparición de nuevas poblaciones de *P. infestans* que en algunos lugares desplazaron a las existentes en pocos años (Spielman *et al.* 1991, Sujkowski *et al.* 1994, Lebreton y Andrivon 1998). Al parecer dichas poblaciones fueron introducidas mediante una migración, transportados por una embarcación de tubérculos de papa en 1976 (Nienderhauser 1991). Consecuentemente las nuevas poblaciones se han expandido a otras regiones del mundo por medio del comercio (Fry *et al.* 2009).

México tiene la mayor diversidad genética de las poblaciones de *P. infestans* en el mundo, sobre todo en las partes altas del centro del país, en estados como México, Michoacán, Morelos y Tlaxcala, donde generalmente ocurren los dos tipos de compatibilidad en una proporción de 1:1 o cercana a esta (Goodwin *et al.* 1992b, Grünwald *et al.* 2001, Garay-Serrano 2005, Díaz-Celaya 2008). En el valle de Toluca se ha comprobado que las poblaciones son sexuales, dado que se han observado oosporas producidas de manera natural tanto en suelo (Fernández-Pavía *et al.* 2004), como sobre folíolos, tallos (Perches y Galindo 1969) y tubérculos (Fernández-Pavía *et al.* 2002) de cultivos de papa, así como en especies silvestres de *Solanum* (Flier *et al.* 2001). En Michoacán, también se ha reportado la presencia de oosporas sobre folíolos de cultivos de papa infectados con tizón tardío (Fernández-Pavía *et al.* 2005). En contraste, existen poblaciones clonales como es el caso de Sinaloa, Puebla y Coahuila, en donde generalmente sólo se detecta un TC en una misma zona productora o si se han reportado ambos tipos de compatibilidad, la proporción

es muy desigual, o bien puede existir incompatibilidad sexual entre los aislamientos presentes en una misma región (Goodwin *et al.* 1992b, Jaime-García 2000, Garay-Serrano 2005).

Hoy en día existe una amplia diversidad en cuanto a la estructura de las poblaciones genéticas de *P. infestans* entre las diferentes regiones del mundo. Los cuales varían de acuerdo principalmente a la presencia o ausencia de reproducción sexual y a la migración de nuevas cepas entre los países productores de papa y jitomate. De esta manera, se pueden detectar poblaciones que se encuentran en constante cambio y otras que permanecen como clonales (McLeod *et al.* 2001, Day *et al.* 2004, Páez *et al.* 2005, Gotoh *et al.* 2005, Fry *et al.* 2009).

### **III.5. ESPECIFICIDAD DE HOSPEDERO DE *Phytophthora infestans***

Se han reportado casos de algún grado de especificidad de hospederos de *P. infestans* sobre papa y jitomate en diferentes partes del mundo. Por ejemplo, en Ecuador y Brasil sólo un genotipo ha sido encontrado infectando jitomate (US-1) y otro a la papa (EC-1, TC A1 en Ecuador y BR-1, TC A2 en Brasil). Cuando se hicieron pruebas de patogenicidad se observó que los aislamientos fueron más agresivos sobre sus hospederos originales que en los alternativos (Oyarzun *et al.* 1998, Suassuna *et al.* 2004). Otros casos se han reportado en Francia y Suiza, donde se observó que los aislamientos, aunque fueron patogénicos en ambos hospederos, generalmente fueron más agresivos en su hospedero original (Knapova and Gisi 2002). Asimismo, en un estudio previo en Francia encontraron cuatro genotipos isoenzimáticos diferentes de los cuales, tres estuvieron presentes en ambos hospederos, pero el genotipo más frecuente encontrado en uno de los hospederos fue el menos frecuente en el otro (Lebreton y Adivon 1998).

En contraste, existen regiones en el mundo en los que no se ha observado especificidad de hospederos de *P. infestans*, ya que los aislamientos observados en dichas regiones son virulentos en ambos hospederos, tales casos se han observado

por ejemplo en Taiwan (Chen *et al.* 2008), Los Países Bajos (Fry *et al.* 1991) y Marruecos (Sedegui *et al.* 2000). De tal manera que los reportes de la especificidad de hospedero de poblaciones de *P. infestans* sobre papa y jitomate varían entre las diferentes regiones geográficas, lo cual muestra la gran plasticidad genotípica que presenta este patógeno (Knapova y Gisi 2002, Chen *et al.* 2008).

Con respecto a México, se tiene información únicamente de la parte noreste de México. Se estudiaron 88 aislamientos provenientes de cultivos de jitomate y papa; se observó sólo un genotipo multilocus para los aislamientos de jitomate, el cual también se observó en aislamientos de papa, pero en muy baja frecuencia (Goodwin *et al.* 1992b). En un trabajo posterior, con aislamientos provenientes de México (Los Mochis, Sinaloa), Estados Unidos y los Países Bajos, tanto de papa como de jitomate, se demostró la existencia de especialización de hospedero de *P. infestans* a jitomate, mediante la determinación de la agresividad de cada uno de los aislamientos en los dos hospederos tanto en campo como en laboratorio (Legard *et al.* 1995). En otro estudio se observó que los genotipos presentes fueron más agresivos en el cultivo de jitomate que en el de papa, puesto que los brotes de la enfermedad fueron más frecuentes en jitomate durante dos años seguidos (Jaime-García 2000).

#### IV. HIPÓTESIS

- Las poblaciones de *P. infestans* obtenidas de jitomate y de papa están conformadas por diferentes genotipos y son incompatibles.
- Existe mayor variabilidad genética en los aislamientos de *P. infestans* obtenidos de campo que en los de invernadero.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad de aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de jitomate con tizón tardío, provenientes de campo e invernadero.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el tipo de compatibilidad (A1 y A2) de los aislamientos de *P. infestans* de jitomate y detectar si existe incompatibilidad al cruzar aislamientos de *P. infestans* de papa con aislamientos de jitomate.
- Determinar si los aislamientos son infectivos en ambos cultivos mediante pruebas de patogenicidad.
- Evaluar la sensibilidad de los aislamientos a mefenoxan, utilizando diferentes concentraciones (0, 5 y 100 µg/ml).
- Detectar los diferentes genotipos existentes de *P. infestans*, para las isoenzimas *Glucosa-6-fosfato isomerasa* (*Gpi*) y *Peptidasa* (*Pep*).
- Determinar el haplotipo mitocondrial utilizando los iniciadores F2/P2 y F4/P4.

## VI. VARIABILIDAD DE POBLACIONES DE *Phytophthora infestans* OBTENIDAS DE JITOMATE

### VI.1. RESUMEN

El jitomate es la hortaliza con mayor superficie cultivada y la de mayor producción en Michoacán. Sin embargo, su cultivo es afectado por el tizón tardío, una devastadora enfermedad que es ocasionada por el oomicete *Phytophthora infestans*. Las poblaciones de este patógeno que atacan al jitomate han sido poco estudiadas en México. Por lo cual, se caracterizaron en este estudio aislamientos de *P. infestans* obtenidos de jitomate, tanto de campo como de invernadero, provenientes de cinco localidades del estado de Michoacán mediante diferentes marcadores moleculares. Asimismo, se determinó si los aislamientos obtenidos son infectivos tanto en jitomate como en papa mediante pruebas de patogenicidad y se determinó si existe incompatibilidad entre aislamientos obtenidos de estos dos cultivos. Se detectaron aislamientos con TC A1, A2 y homotáticos en campo, mientras que en invernadero únicamente se observó el TC A2. Los aislamientos obtenidos en cultivos de campo fueron más susceptibles al mefenoxam mientras que la mayoría de los que se aislaron en invernadero fueron tolerantes. Se detectaron tres genotipos dilocus para las isoenzimas *Glucosa 6-fosfato-isomerasa* y *Peptidasa*. Únicamente se encontró el haplotipo mitocondrial I-a. Los aislamientos de jitomate fueron patogénicos tanto en papa como en jitomate por lo tanto no se observó especificidad de hospederos. Se encontró mayor diversidad fenotípica y genotípica en campo que en invernadero. No hubo incompatibilidad entre aislamientos de *P. infestans* provenientes de diferente hospedero. La composición genética de las poblaciones del patógeno en jitomate es similar a la reportada en papa, ya que todos los genotipos detectados en este estudio fueron reportados previamente en dicho cultivo. Esto sugiere que las mismas poblaciones del patógeno son capaces de infectar tanto a papa como a jitomate en el estado, por lo cual el riesgo de infecciones cruzadas es mayor, dificultándose el control de la enfermedad.

## VI.2. ABSTRACT

Tomato is the horticultural crop with more acreage planted and the highest production in Michoacan. However, this crop is affected by late blight, a devastating disease caused by the oomycete *Phytophthora infestans*. Few studies of the populations of this pathogen that attack tomato exist in Mexico. Therefore, isolates obtained from commercial tomato fields and greenhouses in five locations of Michoacan, were characterized using different markers. Also, pathogenicity tests were conducted to determine whether the isolates are infective in tomato as well as in potato and it was tested if incompatibility between isolates obtained from these two crops existed. Isolates with both mating types were found in the field, as well as homothallic organisms. In the greenhouse only the mating type A2 was observed. Most field isolates were sensitive to mefenoxam, while in the greenhouse the majority was tolerant. Three dilocus genotypes were detected for isozyme *Glucose 6-phosphate isomerase* and *peptidase*. Only mitochondrial haplotype I-a was detected. Tomato isolates were pathogenic on both potato and tomato therefore, host specificity was not observed. The genotypic and phenotypic diversity was higher in the field than in the greenhouse. There was no incompatibility between isolates of *P. infestans* of different host. The genetic composition of pathogen populations on tomato is similar to the ones reported from potato, since all genotypes detected in this study were previously reported on this crop. This suggests that the populations of this pathogen are able to infect both potato and tomato crop in Michoacan, so the risk of infection for both hosts is higher, turning the control of the disease more difficult.

## VI.3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por diferentes tipos de organismos son una amenaza constante para la producción de alimentos en cualquier parte del mundo, por lo cual, mientras más información se tenga acerca de la biología, evolución y dinámica poblacional de los agentes causales de una determinada enfermedad, se incrementa la eficacia de los métodos utilizados para prevenirlas y controlarlas. Una enfermedad

muy conocida internacionalmente es el tizón tardío, ya que causó una epidemia en papa que provocó una hambruna en Irlanda a mediados del siglo XIX, la cual, tuvo como consecuencias, la muerte de más de un millón de personas y la migración de otro millón principalmente hacia EUA (Agrios 2005). Esta enfermedad es causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, un patógeno perteneciente al Phylum Oomycota, que en la actualidad sigue causando importantes pérdidas en los cultivos que ataca, siendo la papa y el jitomate los más afectados (Klarfeld *et al.* 2009).

*P. infestans* se caracteriza por poseer una gran plasticidad genotípica, es un organismo sumamente variable genéticamente que presenta una alta diversidad en virulencia, agresividad y resistencia a fungicidas (Goodwin *et al.* 1992b). Para la caracterización de poblaciones del patógeno se utilizan diferentes marcadores tanto fenotípicos como genotípicos, tales como el tipo de compatibilidad (A1 o A2), la sensibilidad al mefenoxam, los genotipos isoenzimáticos y los haplotipos mitocondriales, entre otros; los cuales proporcionan la información de la estructura de las poblaciones de *P. infestans* presentes en una región determinada (Cooke y Lees 2004).

México es el país con mayor diversidad genética de poblaciones de *P. infestans* en el mundo, y es considerado su centro de origen y diversidad (Flier *et al.* 2003, Lozoya-Saldaña *et al.* 2006a, Chacón-Acosta 2007). Se han realizados diversos estudios de las poblaciones del patógeno en el país, sin embargo, dichos estudios se han enfocado principalmente a la parte central del Valle de México y al cultivo de papa, siendo los reportes de tizón tardío en Michoacán, particularmente del cultivo de jitomate muy escasos (Goodwin *et al.* 1992b, Jaime-García *et al.* 2000, Garay-Serrano 2005, Fernández-Pavía *et al.* 2005, Tovar-García 2008).

De acuerdo con los estudios que se han realizado en Michoacán, la diversidad de poblaciones de *P. infestans* es alta, en total se han detectado 53 genotipos multilocus (Fernández-Pavía *et al.* 2005, Garay-Serrano 2005, Lozoya-Saldaña *et al.* 2006a,

Díaz-Celaya 2008). Díaz-Celaya (2008) menciona que la diversidad en el estado es inclusive mayor a la reportada para el Valle de Toluca, que anteriormente se pensaba que era la región donde existía la mayor diversidad genética de *P. infestans* en todo el mundo. Se han reportado ambos tipos de compatibilidad tanto en jitomate como en papa, lo que sugiere que se está llevando a cabo la reproducción sexual entre las poblaciones del patógeno (Fernández-Pavía *et al.* 2005, Tovar-García 2008). Sin embargo, la presencia de los dos tipos de compatibilidad en una misma localidad o inclusive en un mismo cultivo, no garantiza la existencia de reproducción sexual, puesto que, estos pueden ser sexualmente incompatibles (Goodwin *et al.* 1992b).

Se han reportado aislamientos sensibles, tolerantes y resistentes a mefenoxam en papa, los cuales varían en proporción en los diferentes estudios que se han hecho en Michoacán, misma situación que se presenta también a nivel nacional (Matuszak *et al.* 1994, Garay-Serrano 2005, Fernández-Pavía *et al.* 2005). El haplotipo mitocondrial más frecuente en el país es el I-a, seguido del haplotipo II-a y los restantes I-b y II-b son poco frecuentes (Gavino y Fry 2002, Garay-Serrano 2005, Garay-Serrano *et al.* 2007). En Michoacán únicamente se ha detectado el haplotipo I-a en papa (Fernández-Pavía *et al.* 2005, Garay-Serrano 2005).

Los aislamientos de *P. infestans* se han comportado de manera diferente en las diversas regiones del mundo. En varias partes se ha reportado especificidad de hospedero, en donde las poblaciones de *P. infestans* que atacan al jitomate son diferentes a las que atacan a la papa y en otras partes las mismas poblaciones atacan tanto al jitomate como a la papa (Fry *et al.* 1991, Goodwin *et al.* 1992b, Oyarzun *et al.* 1998, Legard *et al.* 1995, Suassuna *et al.* 2004, Chen *et al.* 2008). En México es poco lo que se conoce sobre este tema debido a la falta de estudios de caracterización de poblaciones de *P. infestans* atacando jitomate. En el presente trabajo se caracterizaron poblaciones del oomicete obtenidas de jitomate en Michoacán, utilizando diferentes marcadores.

## VI.4. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.4.1. Obtención de aislamientos

Se colectaron tallos, folíolos y frutos de diferentes variedades de jitomate con lesiones sencillas de tizón tardío en diferentes localidades del Estado de Michoacán, (Fig. 3) tanto en campo como en invernadero. Además, en una localidad se colectaron muestras de un jardín en una casa cercana al cultivo infectado. Se realizó un muestreo dirigido y las muestras se tomaron de parcelas vecinas para evitar la presencia de aislamientos clonales de un mismo brote de la enfermedad.

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Patología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la UMSNH. Los aislamientos se obtuvieron mediante la utilización de tubérculos de papa, siguiendo el protocolo descrito por Garay-Serrano (2005) y se mantuvieron en medio de centeno-agar (MCA) o chícharo-agar.



**Figura 3.** Localidades en donde se realizaron las colectas: (1) Morelia, (2) Atécuaro y (3) Uruapilla, del municipio de Morelia; (4) Copándaro de Galeana, municipio de Copándaro y (5) El Terrero, municipio de Tacámbaro.

#### **IV.4.2. Determinación del Tipo de Compatibilidad**

Se colocó en una caja de Petri con MCA un disco con micelio de un aislamiento con TC A1, y aproximadamente a 1cm de distancia un disco con micelio del aislamiento al que se le determinó el TC. El procedimiento anterior se repitió utilizando esta vez el TC A2. Después de 15 días se observaron las cajas al microscopio óptico para determinar si hubo formación de oosporas. Si el aislamiento en la cruz con A1 formó oosporas se le designó el tipo de compatibilidad A2 y viceversa.

Para determinar si existe incompatibilidad entre aislamientos de jitomate y papa se llevaron a cabo cruza mediante el procedimiento descrito en el párrafo anterior utilizando aislamientos de jitomate y papa. Se cruzaron 33 aislamientos de papa (TC A1) con los aislamientos de jitomate JI07 y J407 (TC A2). Asimismo se realizaron cruza de 40 aislamientos de *P. infestans* de Michoacán obtenidos de papa (TC A2) con el aislamiento de jitomate JI04 (TC A1) de jitomate. Se realizaron dos experimentos para cada tratamiento.

#### **VI.4.3. Pruebas de Patogenicidad**

La pruebas de patogenicidad se realizaron con los aislamientos de jitomate obtenidos en este estudio y con diez cepas provenientes de papa (tomados de la colección de aislamientos de *P. infestans* del Laboratorio de Patología Vegetal del IIAF) los cuales se crecieron en MCA durante 17 a 20 días a 20 °C. Después de este periodo a cada caja se le agregaron 5 ml de agua destilada estéril y se frotó el micelio con un hisopo estéril para desprender los esporangios. La suspensión resultante se colectó en una caja de Petri estéril y se colocó a 4 °C por 1 hora y posteriormente 1 a 2 horas a 15 °C para inducir la liberación de zoosporas. Con el microscopio óptico se determinó si hubo liberación, en los casos en los que esta no se observó la inoculación se realizó con esporangios.

Para las inoculaciones se utilizaron folíolos de jitomate y papa, así como tubérculos de papa, sin embargo, 11 aislamientos se inocularon en frutos en lugar de folíolos de

jitomate. Los foliolos se colocaron con el envés hacia arriba dentro de cajas de Petri de 100 X 15, uno por cada caja, las cuales contenían agar-agua al 2% en sus tapas para que funcionara como una cámara húmeda. Los jitomates se colocaron dentro de pequeños recipientes de plástico, que les sirvieron como soporte para que quedaran erectos, después estos se pusieron en un recipiente de plástico con toallas de papel humedecidas, los que a su vez se colocaron en bolsas de plástico para guardar la humedad. Las papas se cortaron en rodajas y cada una de ellas se colocó en una caja de Petri de 100X15. A cada foliolo, rodaja o fruto se le agregaron 4 gotas de 20 µl de inóculo. Se realizaron dos repeticiones por aislamiento. Transcurridas 24 horas se retiraron las gotas del inóculo de los foliolos con un pañuelo facial. Se revisaron bajo el microscopio después de 4 a 7 días.

#### **VI.4.4. Sensibilidad a Mefenoxam**

Se preparó MCA al que se le adicionó después de esterilizarlo (justo antes de vaciarlo a cajas de petri de 100X15), una solución Stock de mefenoxam de 100mg/ml que se obtuvo a partir del fungicida comercial Ridomil Gold 4E (no menos de 46.2 % en peso) para obtener medio con una concentración de 5 µg/ml y de 100 µg/ml. Como control se utilizó medio MCA sin mefenoxam. Se transfirieron discos de micelio de aislamientos con 8 a 10 días de crecimiento al centro de las cajas Petri MCA con las diferentes concentraciones del fungicida. Se realizaron dos repeticiones por cada concentración y aislamiento. Las cajas se incubaron a 15 °C durante 7 días. Posteriormente se midió el diámetro del crecimiento de micelio en dos direcciones, se promediaron los datos para cada concentración y para cada aislamiento. La determinación de sensibilidad, tolerancia o resistencia a mefenoxam, se realizó de acuerdo con la escala de Reis *et al.* (2003).

#### **VI.4.5. Análisis de las isoenzimas *Pep* y *Gpi***

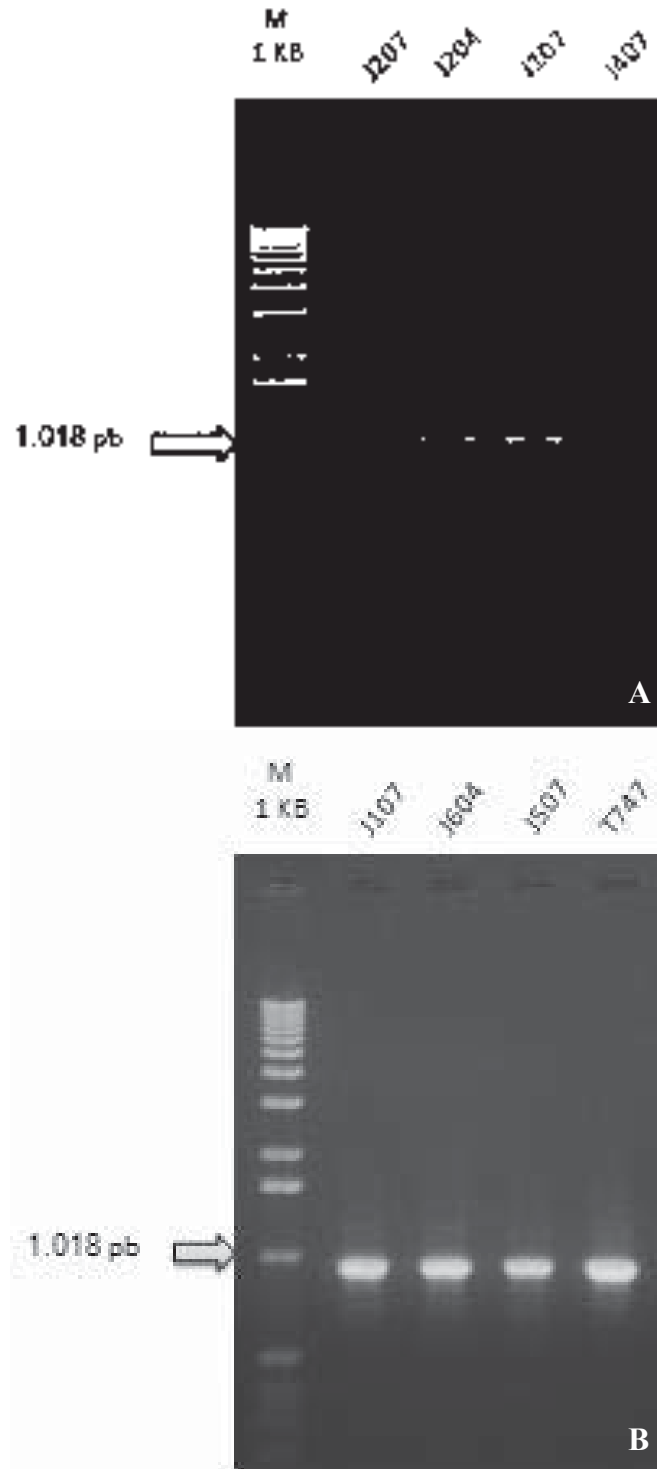
Se seleccionó una muestra de 13 aislamientos para determinar los genotipos de las isoenzimas polimórficas para *P. infestans*: *Glucosa 6-fosfato isomerasa* (*Gpi*) y *Peptidasa* (*Pep*), los cuales, se determinaron siguiendo la técnica de electroforesis

con placas de acetato de celulosa descrita por Goodwin *et al.* (1995). El análisis se realizó utilizando como referencia diferentes patrones electroforéticos de genotipos conocidos para las isoenzimas *Peptidasa (Pep)* y *Glucosa 6-fosfato isomerasa (Gpi)*.

#### **VI.4.6. Determinación de los Haplotipos del ADN-mt**

Los aislamientos se crecieron de 10 a 15 días en medio líquido de chicharo para la obtención de micelio. La extracción de ADN de los aislamientos se realizó en base al protocolo de Goodwin *et al.* (1992a) con modificaciones descritas por Garay-Serrano (2005). El ADN obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% a 50V/90min.

La determinación de los haplotipos mitocondriales se realizó siguiendo el protocolo a base de PCR-RFLP descrito por Griffith y Shaw (1998) con algunas modificaciones en el PCR (Anexo 1). Se amplificaron las regiones P2 y P4 del ADN mitocondrial, con la utilización de los iniciadores F2/P2 y F4/P4, respectivamente (Fig. 4). Los productos obtenidos fueron digeridos con enzimas de restricción: la región P2 con *MspI* y la región P4 con *EcoRI*. Los patrones de DNA obtenidos se verificaron por electroforesis y en base a los sitios de restricción presentes en las dos regiones se determinó el haplotipo de cada aislamiento (Anexo 2).



**Figura 4.** Bandas obtenidas de regiones del ADN-mt mediante PCR: A) región P2 (1070 pb) y B) región P4 (964 pb).

## VI.5. RESULTADOS

### VI.5.1. Aislamientos obtenidos

Se obtuvieron 33 aislamientos de *P. infestans* provenientes de cultivos de jitomate con tizón tardío (Fig. 5); dos en campo, tres en invernadero y un jardín, ubicados en cinco localidades de Michoacán (Cuadro 1). Los aislamientos obtenidos presentaron las características morfológicas típicas de la especie; como son esporangióforos con hinchamientos (Fig. 6) y esporangios semipapilados (Fig. 7).



**Figura 5.** Cultivo de jitomate en campo infectado con tizón tardío en la localidad de El Terrero, Mpio. de Tacámbaro, Michoacán.

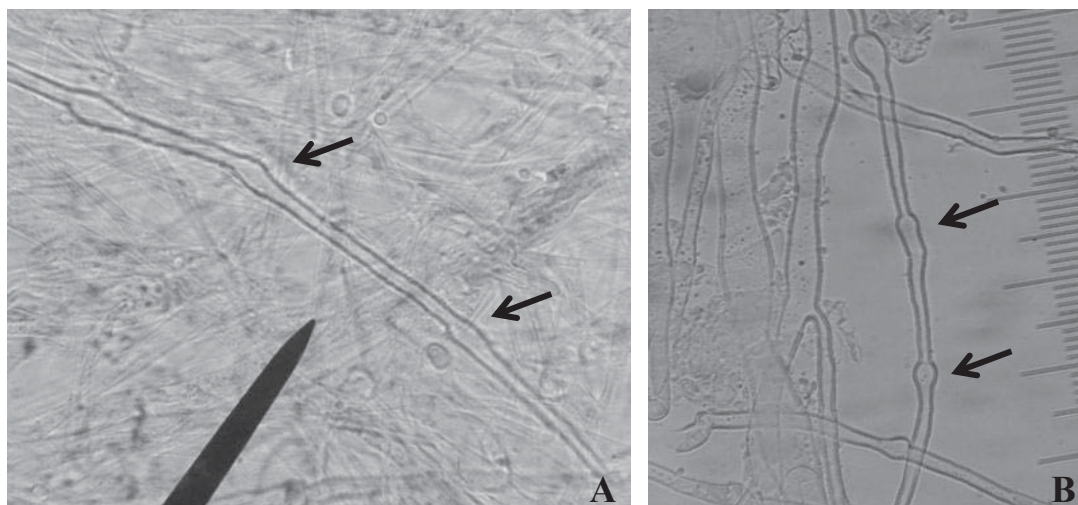
### VI.5.2. Tipo de Compatibilidad

Se detectaron aislamientos con TC A1, A2 y homotáticos. El TC A1 únicamente se presentó en el cultivo de jitomate en Copándaro en una proporción de 1:1 con respecto al TC A2. En Terrero todos los aislamientos fueron homotáticos y en invernadero únicamente se observó el TC A2 (Cuadro 2). Por otro lado, no se detectaron casos de incompatibilidad de aislamientos de jitomate con los de papa, ya que en todas las cruas realizadas se formaron oosporas (Fig. 8). Aunque en

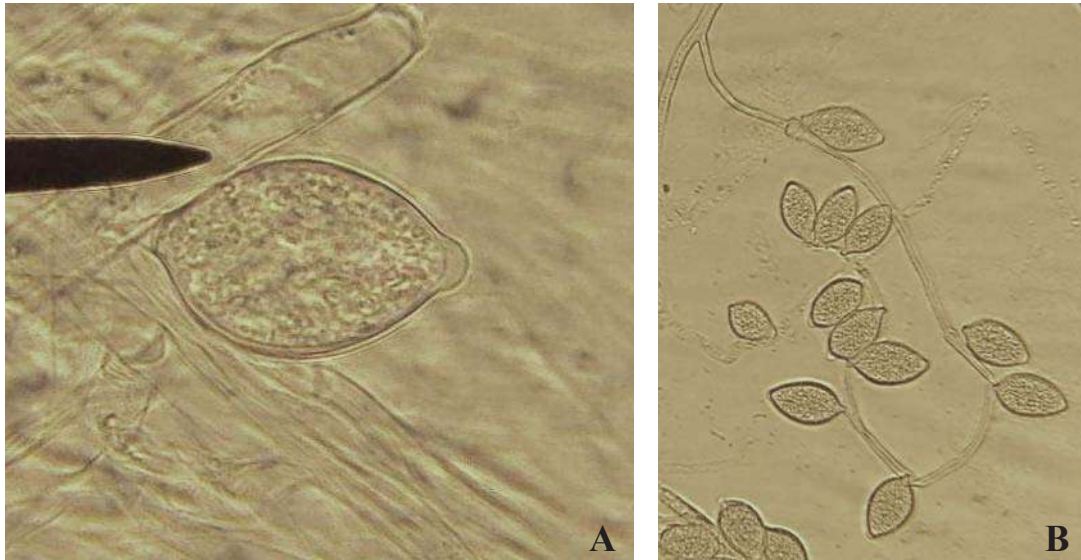
centeno, no todas las cruas fueron compatibles, al realizarse las mismas en medio V8, si se produjeron.

**Cuadro 1.** Localidad, tipo de cultivo y variedad de jitomate de donde fueron obtenidos los aislamientos de *P. infestans*.

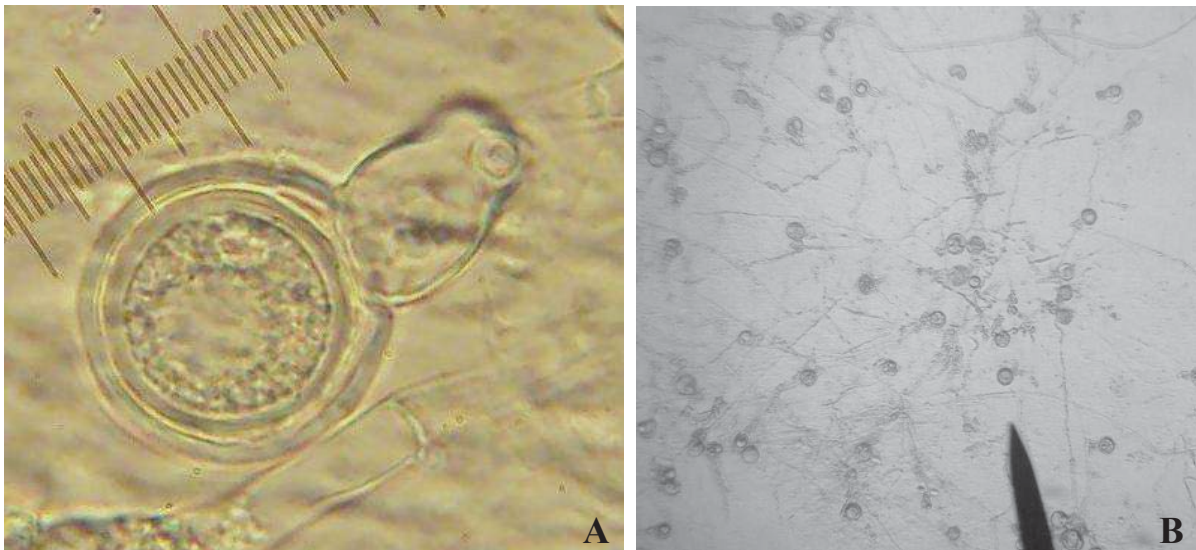
| Localidad            | Tipo de Cultivo | Variedad de cultivo | No. de Aislamientos obtenidos |
|----------------------|-----------------|---------------------|-------------------------------|
| Copándaro de Galeana | Campo           | Desconocido         | 4                             |
| Terrero              | Campo           | Huichol (Saladet)   | 16                            |
| Terrero              | Jardín          | Desconocido         | 3                             |
| Uruapilla            | Invernadero     | Reserva (Saladet)   | 5                             |
| Atécuaro             | Invernadero     | Silvana (Bola)      | 3                             |
| Morelia              | Invernadero     | Charanda            | 2                             |



**Figura 6.** Esporangioforos con hinchamientos de *P. infestans* (aumento 40x): A) obtenido de cultivo en MCA y B) obtenido de jitomate inoculado.



**Figura 7.** Esporangios de *P. infestans*: A) Esporangio (aumento 100X) y B) Esporangióforo con esporangios (aumento 40X).



**Figura 8.** Oosporas de *P. infestans* producidas en una cruce en MCA, con aumento 100X (A) y con aumento 10X (B).

### VI.5.3. Pruebas de Patogenicidad

Los aislamientos obtenidos tanto de jitomate como de papa fueron patogénicos en folíolos de ambos hospederos, así como sobre los frutos de jitomate y las rodajas de papa. Se observó abundante producción de esporangios en las hojas de ambos hospederos, así como en los tubérculos de papa. Sin embargo, en fruto de jitomate la infección fue más lenta. Aunque en los primeros 4 a 5 días se observaba una necrosis blanda-acuosa, se observó colonización de micelio después de 8 a 10 días, además, la producción de esporangios fue bastante escasa. El inicio de la infección de las hojas de papa fue más rápido. Estas presentaron lesiones y micelio dos días después de la inoculación y producción de esporangios a partir del cuarto día. En las hojas de jitomate se presentaron las lesiones a partir del cuarto día y la producción de esporangios ocurrió después del quinto día. En la mayoría de los casos en las hojas de jitomate se observaron manchas ligeramente cloróticas (Fig. 9) en contraste con las hojas de papa en donde la clorosis y la necrosis avanzaron rápidamente (Fig. 10).



**Figura 9.** Folíolos y fruto de jitomate inoculados con *P. infestans* aislado de jitomate. Fotografías tomadas en hojas a los 7 días y en fruto de entre 10 a 15 después de la inoculación.



**Figura 10.** Foliolos y rodajas de papa inoculados con *P. infestans* aislado de jitomate. Fotografías tomadas siete días después de la inoculación.

#### **VI.5.4. Sensibilidad a Mefenoxam**

De los 33 aislamientos obtenidos 20 fueron sensibles, nueve tolerantes y cuatro resistentes al mefenoxam. No obstante, los aislamientos sensibles se encontraron únicamente en los aislamientos de campo, mientras que los aislamientos obtenidos de invernadero en su mayoría fueron tolerantes (Cuadro 2).

#### **VI.5.5. Isoenzimas *Pep* y *Gpi***

Se detectaron tres genotipos diferentes para *Gpi* (100/122, 100/111 y 111/111) y uno para *Pep* (100/100). En total se detectaron cuatro genotipos multilocus (incluyendo TC y genotipos isoenzimáticos), los cuales fueron: A1; 100/122 *Gpi*; 100/100 *Pep*, A1; 100/111 *Gpi*; 100/100 *Pep*, A2; 100/111 *Gpi*; 100/100 *Pep* y A2; 111/111 *Gpi*; 100/100 *Pep*. En el cultivo de Copándaro los tres aislamientos analizados presentaron diferentes genotipos multilocus. En los invernaderos ubicados en Atécuaro y Morelia las poblaciones fueron clonales, mientras que en el invernadero

ubicado en Uruapilla se observó variabilidad en los genotipos isoenzimáticos (Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Tipos de compatibilidad y sensibilidad a mefenoxam de los aislamientos obtenidos.

| Tipo de cultivo | Aislamiento (código) | TC    | Sensibilidad a Mefenoxam |
|-----------------|----------------------|-------|--------------------------|
| Campo           | J104                 | A1    | Sensible                 |
|                 | J204                 | A2    | Tolerante                |
|                 | J404                 | A1    | Tolerante                |
|                 | J604                 | A2    | Tolerante                |
|                 | 1H                   | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 2H                   | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 3H                   | A1/A2 | sensible                 |
|                 | 4H                   | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 5H                   | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 6H                   | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 7H                   | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 9H                   | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 10H                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 11H                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 11F                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 12H                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 12F                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 13H                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 13F                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | 14H                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | C1H                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | C3H                  | A1/A2 | Sensible                 |
|                 | C4H                  | A1/A2 | Sensible                 |
| Invernadero     | J107                 | A2    | Resistente               |
|                 | J207                 | A2    | Resistente               |
|                 | J407                 | A2    | Resistente               |
|                 | J507                 | A2    | Tolerante                |
|                 | J607                 | A2    | Tolerante                |
|                 | J707                 | A2    | Resistente               |
|                 | J807                 | A2    | Tolerante                |
|                 | J907                 | A2    | Tolerante                |
|                 | TF5                  | A2    | Tolerante                |
|                 | TF9                  | A2    | Tolerante                |

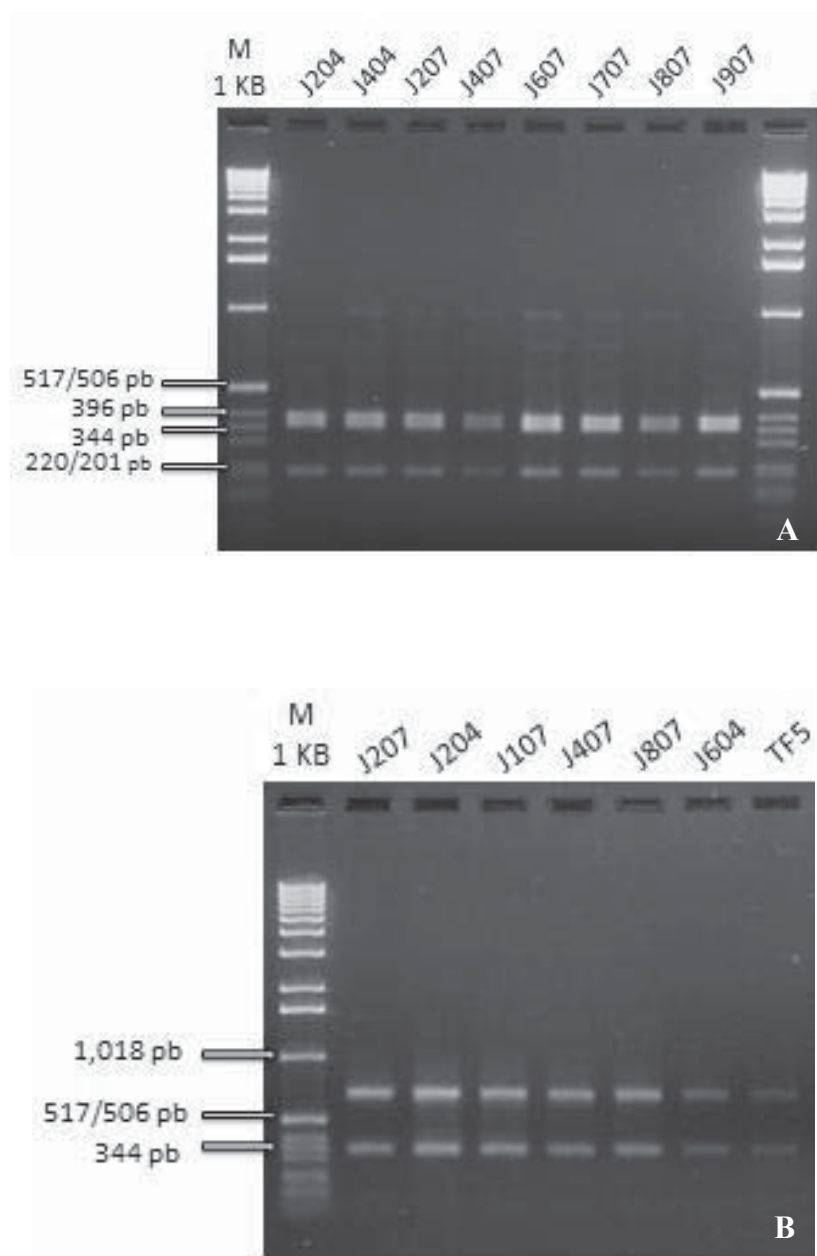
### VI.5.6. Haplotipos del ADN-mt

Se determinó el haplotipo mitocondrial en 28 aislamientos. Todos pertenecen al haplotipo I. De acuerdo al resultado de la digestión de la región P4 con *EcoRI* y P2 con *MspI*, 12 aislamientos se determinaron como I-a (Cuadro 3). Debido a que los patrones de bandeo obtenidos con las dos anteriores digestiones, demostraron la presencia de los sitios de restricción típicos de este haplotipo (Fig. 11).

**Cuadro 3.** Características de los aislamientos analizados en cada localidad.

| Localidad   | TC    | Pep     | Gpi     | No. de aislamientos | Sensibilidad a mefenoxam        | Haplotipo Mitocondrial |
|-------------|-------|---------|---------|---------------------|---------------------------------|------------------------|
| Copándaro   | A1    | 100/100 | 100/122 | 1                   | Sensible                        | I                      |
|             | A2    | ND*     | ND      | 1                   | Tolerante                       | I-a                    |
|             | A1    | 100/100 | 100/111 | 1                   | Tolerante                       | I                      |
|             | A2    | 100/100 | 100/111 | 1                   | Tolerante                       | I-a                    |
| Uruapilla   | A2    | 100/100 | 111/111 | 4                   | Resistente (3)<br>Tolerante (1) | I-a                    |
|             | A2    | 100/100 | 100/111 | 1                   | Tolerante                       | I-a                    |
| Atécuaro    | A2    | 100/100 | 100/111 | 3                   | Resistente (1)<br>Tolerante (2) | I-a                    |
| Morelia     | A2    | 100/100 | 100/111 | 2                   | Tolerante (2)                   | I-a                    |
| Terrero     | A1/A2 | ND      | ND      | 16                  | Sensible                        | I (14), 2 (ND)         |
| Terrero (J) | A1/A2 | ND      | ND      | 3                   | Sensible                        | ND                     |

\*No determinado.



**Figura 11.** Patrones de bandeo observados con la digestión de los productos de PCR. A) P4 con *EcoRI*: se observan tres bandas, una de 394pb, otra de 361pb y una de 209pb y B) P2 con *MspI*: se observan dos bandas una de 720pb y otra de 350pb, combinación que es típica del haplotipo I-a, de acuerdo con Griffth y Shaw (1998) (Anexo B).

## VI.6. DISCUSIÓN

La presencia de ambos tipos de compatibilidad junto con la diversidad de genotipos encontrados en Copándaro, sugiere que en esta localidad, las poblaciones de *P. infestans* presentes se están reproduciendo sexualmente. Lo anterior, es importante puesto que indica que las poblaciones se están diversificando y esto puede dificultar el control de la enfermedad en próximas siembras (Fernández-Pavía *et al.* 2005). Asimismo, si no se lleva a cabo el control adecuado, estas nuevas cepas pueden migrar a otros países y ocasionar epidemias que pueden ser difíciles de controlar, ya que Michoacán es un importante exportador de jitomate (Becerra-Ibarra 2010).

Los aislamientos obtenidos en la localidad del Terrero ubicada en campo, tanto en el cultivo comercial como en el jardín, parecen haber sido infectadas por un mismo linaje clonal de *P. infestans*. Todos fueron homotáticos, los 14 aislamientos analizados para haplotipos mitocondriales presentaron el haplotipo I y todos fueron sensibles al mefenoxam. Al parecer, las plantas de jitomate del jardín fueron infectadas primero, puesto que el brote de la enfermedad en estos se presentó aproximadamente una semana antes de que se observaran síntomas en el cultivo comercial.

En el jardín las plantas de jitomate crecieron a partir de restos de frutos de jitomate colocados en el suelo, los cuales probablemente estaban infectados con el patógeno, o bien el patógeno se encontraba en el suelo, o esporangios fueron transportados a estas plantas de cultivos circundantes, ya que había plantaciones cercanas. La enfermedad se desarrolló rápidamente en estas plantas por que se presentaron constantes lluvias (finales de Agosto 2010) y temperaturas bajas, adicionado a que dichas plantas se ubicaban bajo la sombra de un árbol de aguacate por lo que las condiciones eran óptimas para el patógeno. El patógeno probablemente fue transportado por medio del viento del jardín hacia el cultivo comercial, el cual se encontraba a escasos metros del jardín. La enfermedad se inició en el cultivo en la parte más baja, ya que este se encontraba en una pendiente y la humedad relativa

era mayor. En Estados Unidos de América se ha observado que a partir de plántulas infectadas de jitomate sembradas en huertos familiares, el patógeno se ha desplazado a cultivos comerciales ocasionando daños importantes (Frank Martin, comunicación personal).

La presencia de un sólo linaje clonal, indica que existe poca variabilidad en esta localidad. Por lo cual, la enfermedad puede ser erradicada más fácilmente con la ayuda de adecuadas prácticas culturales, tales como: eliminación de las pilas de desecho de cultivos anteriores, rotación de cultivos, drenaje adecuado, utilización de semilla libre del patógeno y la aplicación oportuna de fungicidas, entre otras.

Es interesante resaltar que en esta localidad se hayan aislado únicamente individuos homotáticos, ya que esta situación no se había presentado en ningún estudio anterior en ninguna parte del mundo, no obstante, resulta lógico ya que al estar presente únicamente un linaje clonal, este tiene un TC único que resultó ser homotático. Sin embargo, cabe la posibilidad de que estos aislamientos en realidad sean del TC A2, se ha observado que este TC bajo ciertas condiciones, es muy propenso a producir oosporas sin haber sido cruzado con el TC opuesto (Mosa *et al.* 1989, Goodwin y Drenth 1997, Smart *et al.* 2000). Asimismo, la cantidad de oosporas producidas en cultivos puros fue muy baja (cinco o menos oosporas en cada caja), pero aumentó considerablemente al cruzarlos con aislamientos con TC A1; en cambio cuando se cruzaron con TC A2, no aumentó o lo hizo en menor medida, además las oosporas producidas no eran normales, ya que estaban abortadas o deformes, o no presentaban anteridios.

En los cultivos en invernadero sólo se encontró el TC A2. En general, los aislamientos fueron clonales en cuanto a su genotipo isoenzimático, lo cual era de esperarse, debido a que en condiciones controladas, es poco probable que más de una cepa llegue al mismo cultivo.

Los aislamientos de *P. infestans* obtenidos de jitomate y papa en Michoacán son compatibles entre ellos. A diferencia de lo que se reportó para aislamientos de papa y jitomate obtenidos en Los Mochis, Sinaloa, los cuales al ser cruzados entre ellos resultaron ser incompatibles sexualmente (Goodwin *et al.* 1992b). Esta puede ser la razón de que exista poca variabilidad genética en esa localidad. En comparación con la que hay en estados como Michoacán y México que tienen una alta diversidad. Existen evidencias de reproducción sexual puesto que se han observado oosporas formadas de manera natural (Fernández-Pavía *et al.* 2004, Fernández-Pavía *et al.* 2005).

El hecho de que los aislamientos obtenidos en este estudio fueran capaces de infectar los dos hospedantes, es una evidencia de que no existe especificidad de hospederos de *P. infestans*, por esta razón el riesgo de que la enfermedad se expanda más rápido es mayor. De tal manera que si se encuentran cultivos de papa y jitomate cercanos uno del otro puede haber infecciones cruzadas, que pueden provocar severas epidemias en los dos cultivos, lo cual dificultará el manejo y las pérdidas serán mayores.

La gran mayoría de los aislamientos obtenidos en campo fueron sensibles al mefenoxam, mientras que en invernadero en general fueron tolerantes y no se encontraron aislamientos sensibles. Lo que es un reflejo de que el uso frecuente de fungicidas en invernadero ha ejercido presión de selección, puesto que los aislamientos sensibles han sido desplazados por los tolerantes y resistentes en dicha modalidad de cultivo, lo cual se podría presentar en campo en poco tiempo si no se toman medidas adecuadas. La mejor manera de prevenir la enfermedad en invernadero, es realizando prácticas culturales que disminuyan la incidencia, tales como: utilización de semillas libres del patógeno, ventilación adecuada, evitar goteras, no plantar muy densamente, revisión rutinaria para detectar a tiempo el inicio de la enfermedad. Si estas prácticas se llevan a cabo, se podrá disminuir el uso

de fungicidas, lo cual también ayudará en la economía de los productores ya que se bajará el capital que invierten en la compra de estos productos.

En algunas partes del mundo la sensibilidad a mefenoxam está relacionada con algún genotipo isoenzimático, TC o haplotipo mitocondrial, como se ha reportado en Rusia, Israel, Estados Unidos y algunos países asiáticos (Goodwin *et al.* 1996, Elansky *et al.* 2001, Cohen 2002, Gotoh *et al.* 2005). En México, la situación es diferente, puesto que no se ha reportado ninguna relación entre la sensibilidad o resistencia de los aislamientos con respecto a su genotipo o TC (Matuszak *et al.* 1994, Garay-Serrano 2005). En Michoacán tampoco se ha observado que exista correlación, después de los estudios que se han llevado a cabo (Matuszak *et al.* 1994, Garay-Serrano 2005, Fernández-Pavía *et al.* 2005, Díaz-Celaya 2008), situación que se repite para los aislamientos obtenidos en este estudio.

Se ha reportado una gran variabilidad de poblaciones de *P. infestans* atacando a papa en Michoacán. De tal manera, que todos los genotipos multilocus detectados en este estudio en jitomate, han sido previamente reportados atacando al cultivo de papa en el Estado y en otras partes de México (Garay-Serrano 2005, Fernández-Pavía *et al.* 2005, Díaz-Celaya 2008, Tovar-García 2008). Sin embargo, sólo dos de estos genotipos habían sido encontrados en jitomate: el A1, 100/122 *Gpi*, 100/100 *Pep*; y el A2, 100/111 *Gpi*, 100/100 *Pep* tanto en Michoacán (Tovar-García 2008) como en Sinaloa (Jaime-García *et al.* 2000), mientras que los otros dos (A1, 100/111 *Gpi*, 100/100 *Pep*; y A2, 111/111 *Gpi*, 100/100 *Pep*) se reportan por primera vez en dicho hospedante en México.

Todos los aislamientos analizados para el haplotipo mitocondrial presentaron el haplotipo I-a, lo cual es consistente con lo que se ha reportado para papa en Michoacán, ya que únicamente se ha reportado este haplotipo en el estado (Fernández-Pavía *et al.* 2005; Garay-Serrano 2005). La presencia de un mismo haplotipo mitocondrial en todas las poblaciones de *P. infestans* tanto de papa como

jitomate en Michoacán, es otra evidencia de que pueden presentarse infecciones cruzadas de tizón tardío entre estos cultivos. Además, este hecho sugiere que la migración de las poblaciones de *P. infestans* desde otros estados del país, es poco frecuente, puesto que no se han introducido alguno de los otros haplotipos descritos anteriormente, por lo tanto se podría suponer que la variabilidad que se presenta en el estado es debida exclusivamente o al menos en su mayoría a la reproducción sexual.

## VII. CONCLUSIONES

Se detectaron 2 aislamientos con tipo de compatibilidad A1, 12 con TC A2 y 19 homotáticos. El TC A2 se presentó en todas las modalidades de cultivo. El tipo de compatibilidad A1 y aislamientos homotáticos únicamente se reportaron en campo.

Al realizar cruzas no se detectó incompatibilidad entre aislamientos de jitomate y papa.

Los aislamientos fueron infectivos en ambos hospederos, por lo tanto, no se detectó especificidad de hospederos (papa y jitomate) en aislamientos de *P. infestans*.

La mayoría de los aislamientos obtenidos en cultivos de campo fueron sensibles al mefenoxam, mientras que en los aislados en invernadero predominaron los tolerantes.

Se detectó un genotipo para *Pep* (100/100) y tres para *Gpi* (122/100, 111/100 y 111/111).

Se detectó la presencia del haplotipo mitocondrial I-a en cepas de *P. infestans* provenientes de jitomate.

Se observó mayor diversidad fenotípica y genotípica en campo que en invernadero.

## VIII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

Aunque en Michoacán se ha reportado una estructura poblacional de *P. infestans* muy diversa, en realidad los estudios que se han realizado son muy escasos en comparación a la gran cantidad de municipios que se dedican al cultivo de la papa y el jitomate en el estado. Por esta razón se hace evidente la necesidad de llevar a cabo un estudio mas detallado acerca de las poblaciones de *P. infestans*, que incluyan mas zonas productoras tanto de jitomate como de papa, que aporten un panorama mas general acerca de las características de las poblaciones de este patógeno. Con lo cual, se implementarán métodos de control más eficientes. Además se podrán diseñar programas de detección de la enfermedad que permitan aprovechar de manera óptima la utilización de los fungicidas, evitando el excesivo uso de estos y el gasto innecesario que esto conlleva.

Otro aspecto importante es que los resultados obtenidos en este tipo de investigaciones lleguen a manos de los productores. Para lo cual, es necesario que se capacite más gente que los pueda asesorar, puesto que no cuentan ni con el conocimiento ni con la tecnología adecuada para el manejo del cultivo, lo cual conlleva a que no aprovechen al máximo sus tierras y la producción sea baja. En muchos casos debido a la falta de conocimiento de los productores acerca de cómo manejar alguna enfermedad, terminan perdiéndolo todo, a pesar de que las pérdidas se pueden reducir aplicando los productos de control adecuados o realizando algunas modificaciones en las prácticas culturales.

## IX. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5<sup>a</sup> ed. Academic Press. Burlington. USA. 992pp.
- Becerra-Ibarra, S. A. 2010. La producción Michoacana de jitomate la más importante en el país. <http://www.oem.com.mx/elsoldezamora/notas/n1642971.htm> (Consultada diciembre de 2010).
- Becktell, M. C., C. D. Smarth, C. H. Haney y W. E. Fry. 2006. Host-Pathogen interactions between *Phytophthora infestans* and the solanaceous hosts *Calibrachoa x hibridus*, *Petunia x hibrida*, and *Nicotiana benthamiana*. Plant Disease 90: 24-32.
- Bodker, L. y B. J. Nielsen. 2001. Preventive and curative effect of fungicides against potato late blight under field conditions. En: Westerdijk, C. E. y H. T. A. M. Schepers (ed.) Proceedings of the workshop on the European network for development of an integrated control strategy of potato late blight. PAV-Special Report no. 7. Munich, Alemania. pp. 261-264.
- Bohs, L. y R. G. Olmstead. 1997. Phylogenetic relationships in *Solanum* (Solanaceae) based on *ndhF* sequences. Systematic Botany 22 (1): 5-7.
- Bohs, L. 2005. Major clades In *Solanum* Based on *ndhF* sequence data. En: R. C. Keating, V. C. Hollowell, y T. B. Croat (ed.) A festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist. Missouri Botanical Garden, St Louis, Missouri, USA. pp. 27-49.
- Carter, D. A., S. A. Archer, K. W. Buck, D. S. Shaw y R. C. Shattock. 1991. DNA polymorphism in *Phytophthora infestans*: the UK experience. En: Lucas, J. A., R. C. Shattock, D. S. Shaw y L. R. Cooke (Ed.). *Phytophthora*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. pp. 272-294.
- Chacón-Acosta, M. G. 2007. Variability of *Phytophthora infestans sensu lato* in the highland tropics of Ecuador. Doctoral Thesis. Swiss Federal Institute of Technology Zurich. Cornell University. 151 pp.
- Chen, C. H., Z. M. Sheu, y T. C. Wang. 2008. Host specificity and tomato-related race composition of *Phytophthora infestans* isolates in Taiwan during 2004 and 2005. Plant Disease 92:751-755.

- Cohen, Y. y M. Reuveni. 1983. Occurrence of metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato fields in Israel. *Phytopathology* 73: 925-927.
- Cohen, Y. 2002. Populations of *Phytophthora infestans* in Israel underwent three major genetic changes during 1983 to 2000. *Phytopathology* 92: 300-307.
- Cooke, D. E. L. y A. K. Lees. 2004. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology* 53: 692-704.
- Cooke, D. E. L., V. Young, P. R. J. Birch, R. Toth, F. Gourlay, J. P. Day, S. F. Carnegie y J. M. Duncan. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). *Plant Pathology* 52: 181-192.
- Day, J. P., R. A. M. Wattier, D. S. Shaw y R. C. Shattock. 2004. Phenotypic and genotypic diversity in *Phytophthora infestans* on potato in Great Britain, 1995-98. *Plant Pathology* 53: 303-315.
- Deahl, K. L. 2007. Occurrence of late Blight in the USA. En: H.T.A.M. Schepers (Ed.) Special Report No. 12. Proceedings of the tenth workshop of a European network for development of an integrated control strategy of potato late blight. Bologna, Italy. pp. 27-28.
- Díaz-Celaya, M. 2008. Variabilidad de *Phytophthora infestans* procedente de zonas productoras de papa de Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México. 47 pp.
- Elansky, S., A. Smirnov, Y. Dyakov, A. Dolgova, A. Filippov, B. Kozlovsky, I. Kozlovskaya, P. Russo, C. Smart y W. Fry. 2001. Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow region, Siberia and Far East. *Journal of Phytopathology* 149: 605-611.
- Erwin, D. C. y O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. APS PRESS, The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. 562 pp.
- Esquinas-Alcázar, J. y F. Nuez. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. En: F. Nuez (ed.). *El cultivo del tomate*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 793 pp.

- FAOSTAT. 2010. Food and Agricultural commodities production. <http://faostat.fao.org> (Consultada enero de 2011).
- Fernández-Pavía, S. P., N. J. Grünwald y W. E. Fry. 2002. Formation of *Phytophthora infestans* oospores in nature on tubers in central Mexico. *Plant Disease* 86: 73.
- Fernández-Pavía, S. P., N. J. Grünwald, M. Díaz-Valasis, M. Cadena-Hinojosa y W. E. Fry. 2004. Soilborne oospores of *Phytophthora infestans* in central Mexico survive winter fallow and infect potato plants in the field. *Plant Disease* 88: 29-33.
- Fernández-Pavía, S. P., G. Rodríguez-Alvarado, E. Garay-Serrano, C. R. Belmar-Díaz, A. K. Sturbaum, y H. Lozoya-Saldaña. 2005. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary provenientes de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:193-199.
- Flier, W. G., N. J. Grünwald, W. E. Fry y L. J. Turkenstein. 2001. Formation, production and viability of oospores of *Phytophthora infestans* from potato and *Solanum demissum* in the Toluca Valley, central Mexico. *Mycological Research* 105 (8): 998-1006.
- Flier, W. G., N. J. Grünwald, L. P. N. M. Kroon, A. K. Sturbaum, T. B. M. van den Bosch, E. Garay-Serrano, H. Lozoya-Saldaña, W. E. Fry, and L. J. Turkensteen. 2003. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca Valley of central Mexico suggests genetic differentiation between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp. *Phytopathology* 93:382-390.
- Foreign Agricultural Service/USDA. 2009. World Markets and trade: Fresh tomatoes. <http://www.fas.usda.gov/http/2009%20Tomato%20Article.pdf> (Consultada enero de 2011).
- Fry, W. E., A. Drenth, L. J. Spielman, B. C. Mantel, L. C. Davidse, y S. B. Goodwin. 1991. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Phytopathology* 81 (10): 1330-1336.
- Fry, W. E., S. B. Goodwin, A. T. Dyer, J. M. Matuszak, Y. J. Koh, A. Drentah, B. A. Cohen, L. J. Spielman, P. W. Tooley, K. L. Deahl, L. S. Sujkowski, D.A. Inglis y

- K. P. Sandlan. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, pathways, and implications. *Plant Disease* 77 (7): 653-661.
- Fry, W. E. 1998. Late Blight of Potatoes and Tomatoes.  
[http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Potato\\_LateBlt.html](http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Potato_LateBlt.html)  
(Consultada enero de 2010).
- Fry, W. E., N. J. Grünwald, D. E. L. Cooke, A. Mcleod, G. A. Forbes y K. Cao. 2009. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. En: K. Lamour y S. Kamoun (eds.) *Oomycete Genetics and Genomics, diversity, interactions and research tools*. WILEY-BLACKWELL. USA. pp. 139-164.
- Garry, G., G. A. Forbes, A. Salas, M. Santa Cruz, W. G. Pérez y R. J. Nelson. 2005. Genetic diversity and host differentiation among isolates of *Phytophthora infestans* from cultivated potato and wild solanaceous hosts in Peru. *Plant Pathology* 54: 740-748.
- Garay-Serrano, E. 2005. Variabilidad genética de poblaciones de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary en México. Tesis de Maestría. Instituto de Fitosanidad, C P. Montecillo, Edo. de México. 79 pp.
- Garay-Serrano, E., S. P. Fernández-Pavía, G. Rodríguez-Alvarado, E. G. Flier, H. Lozoya-Saldaña, R. I. Rojas-Martínez, E. M. Goss y N. J. Grünwald. 2007. First report of haplotype I-b of *Phytophthora infestans* in Central Mexico. *Plant Disease* 91 (7): 909.
- Gavino, P. D. y W. E. Fry. 2002. Diversity in and evidence for selection on the mitochondrial genome of *Phytophthora infestans*. *Mycologia* 94 (5): 781-793.
- Goodwin, S. B., A. Drenth y W. E. Fry. 1992a. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Current Genetics* 22: 107-115.
- Goodwin, S. B., L. J. Spielman, J. M. Matuszak, S. N. Bergeron y W. E. Fry. 1992b. Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central México. *Phytopathology* 82: 955-961.

- Goodwin, S. B., B. A. Cohen y W. E. Fry. 1994. Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 11591-11595.
- Goodwin, S. B., R. E. Schneider, y W. E. Fry. 1995. Use of cellulose acetate electrophoresis for rapid identification of allozyme genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 79: 1181-1185.
- Goodwin, S. B., L. S. Sujkowski y 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: 793-800.
- Goodwin, S. B. 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* 87:462-473
- Goodwin, S. B. y A. Drenth. 1997. Origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico. *Phytopathology* 87 (10): 992-999.
- Goodwin, S. B. 2004. Isosyme analysis in fungal taxonomy, genetics, and population biology. En: D. K. Arora (ed.) *Fungal Biotechnology in Agricultural, food, and environmental aplications*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp. 61-79.
- Gotoh, K., S. Akino, A. Maeda, N. Kondo, S. Naito, M. Kato y A. Ogoshi. 2005. Characterization of some Asian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 54: 733-739.
- Griffith, G. W. y D. S. Shaw. 1998. Polymorphism in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4007-4014.
- Grünwald, N. J., W. G. Flier, A. K. Sturbaum, E. Garay-Serrano, T. B. M. van den Bosch, C. D. Smart, J. M. Matuszak, H. Lozoya-Saldaña, L. J. Turkensteen, and W. E. Fry. 2001. Population structure of *Phytophthora infestans* in the Toluca valley region of central Mexico. *Phytopathology* 91:882-890.
- Grünwald, N. J. y W. G. Flier. 2005. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. *Annual Review of Phytopathology* 43: 171-190.

- Hansen, J. G., B. Kleinhenz y E. Jorg. 2001. Results of validation trials of *Phytophthora* DSS in Europe in 2000. En: Westerdijk, C. E. y H. T. A. M. Schepers (ed.) Proceedings of the workshop on the European network for development of an integrated control strategy of potato late blight. PAV-Special Report no. 7. Munich, Alemania. pp. 23-38.
- Hardham, A. R. 2009. The asexual life cycle. En: K. Lamour y S. Kamoun (ed.) Oomycete Genetics and Genomics, diversity, interactions and research tools. Wiley-Blackwell. USA. pp. 93-119.
- Jaime-García, R., R. Trinidad-Correa, R. Felix-Gastelum, T. V. Orum, C. C. Wasmann, y M. R. Nelson. 2000. Temporal and spatial patterns of genetic structure of *Phytophthora infestans* from tomato and potato in the Del Fuerte Valley. *Phytopathology* 90: 1188-1195.
- Jaramillo-Villegas, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Universidad Nacional de Colombia. 137 pp.
- Jarrín, F. 2006. Herramientas moleculares aplicadas a la investigación de *Phytophthora infestans* en la estación de CIP de Quito. [www.quito.cipotato.org/presentambato/.../FJARRIN.doc](http://www.quito.cipotato.org/presentambato/.../FJARRIN.doc) (Consultada febrero de 2011)
- Judelson, H. S. y F. A. Blanco. 2005. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews, Microbiology* 3:47-58
- Kamoun, S. y C. D. Smart. 2005. Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Disease* 89:692-699.
- Knapova, G. and U. Gisi. 2002. Phenotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* 51: 641-653.
- Klarfeld, S., A. E. Rubin, y Y. Cohen. 2009. Pathogenic fitness of oosporic progeny isolates of *Phytophthora infestans* on late-blight-resistant tomato lines. *Plant Disease* 93: 947-953.
- Ko, W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: Evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *Journal of General Microbiology* 107: 15-18

- Lebreton, L. y D. Andrivon. 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *European Journal of Plant Pathology* 104: 583-594.
- Legard, D. E., T. Y. Lee y W. E. Fry. 1995. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: Aggressiveness on tomato. *Phytopathology* 85:1356-1361.
- Lozoya-Saldaña, H., L. Guzmán-Galindo, S. Fernández-Pavía, N. J. Grünwald y E. McElhinny. 2006a. *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. I. Host-pathogen specificity and resistance components. *Agrociencia* 40 (2): 205-217.
- Lozoya-Saldaña, H., M. H. Coyote-Palma, R. Ferrera-Cerrato y M. E. Lara-Hernández. 2006b. Antagonismo microbiano contra *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Agrociencia* 40 (4): 491-499.
- Manfrim, T. D. C. 2002. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* collected in Florida in 1999 and 2001. [http://etd.fcla.edu/UF/UFE1001187/Tombolato\\_D.pdf](http://etd.fcla.edu/UF/UFE1001187/Tombolato_D.pdf) (Consultada septiembre de 2009).
- Martínez, M. C., M. Helguera y A. Carrera. Marcadores moleculares. 2010. En: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (ed.) *Biotecnología y mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. pp. 70-85.
- Matheron, M. 2001. Modes of action for plant disease management chemistries. <http://ag.arizona.edu/crops/diseases/papers/dischemistry.html> (Consultada abril de 2011).
- Matuszak, J. M., J. Fernández-Elguezabel, W. K. Gu, M. J. Villareal-González y W. E. Fry. 1994. Sensitivity of *Phytophthora infestans* population to metalaxyl in México; distribution and dynamics. *Plant Disease* 78: 911-916.
- May, J. y J. B. Ristaino. 2004. Identity of the mt-DNA haplotype (s) of *Phytophthora infestans* in historical specimens from the Irish potato famine. *Mycological Research* 108 (0): 1-9.
- Mcleod, A., S. Denman, A. Sadie y F. D. N. Denner. 2001. Characterization of African isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* 85: 287-291.

- Medina-Ramos, G. 1999. Náhuatl. <http://oz.plymouth.edu/~wjt/Nahuatl/Nahuatl1.pdf> (Consultada mayo de 2011).
- Mesa-Salgado, V. M., M. F. Mideros, S. Jaramillo-Villegas, J. M. Cotes-Torres, L. E. Lagos-Mora, R. P. Pineda y M. Marín-Montoya. 2008. Variabilidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* procedentes del suroeste de Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 167-172.
- Mizubuti, E. S. G. y W. E. Fry. 1998. Temperature effects on developmental stages of isolates from three clonal lineages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 88: 837-843.
- Montarry, J. D. Andrivon, I. Glais, R. Corbier, G. Mialdea y F. Delmotte. 2010. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Ecology* 19: 1965-1977.
- Mosa, A. A., M. Kato, N. Sato, K. Kobayashi y A. Ogoshi. 1989. Occurrence of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* on potato in Japan. *Annual Phytopathological Society of Japan* 55: 615-620.
- Nature Education. 2011. Haplotype/haplotypes. <http://www.nature.com/scitable/definition/haplotype-haplotypes-142> (Consultada marzo de 2011).
- Niederhauser, J. S. 1991. *Phytophthora infestans*: The Mexican connection. En: J. A. Lucas, R. C. Shattock y D. S. Shaw (eds.) *Phytophthora*. Cambridge University Press. London , Great Britain. pp. 25-45.
- Oyarzun, P. J., A. Pozo, M. E. Ordoñez, K. Doucett y G. A. Forbes. 1998. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador. *Phytopathology* 88: 265-271.
- Páez, O., R. Valverde, L. Gómez y Y. A. Brenes. 2004. Determinación del tipo de apareamiento con marcadores moleculares en aislamientos de *Phytophthora infestans* recolectados en plantaciones de papa en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 28 (2): 9-19.

- Páez, O., R. Valverde, L. Gómez y A. Brenes. 2005. Diversidad genética de aislamientos de *Phytophthora infestans* en plantaciones de papa en Costa Rica con el uso de RAPDS. *Agronomía Costarricense* 29 (1): 41-55.
- Peralta, I. E. y D. M. Spooner. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (solanaceae). En: Razdan, M. K. y A. K. Matto (ed.) *Genetic improvement of solanaceous crops vol. 2: Tomato*. Enfield USA: Science publishers. pp. 1-27.
- Perches, S. y A. J. Galindo. 1969. Supervivencia de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, causante del tizón tardío de la papa y jitomate. *Agrociencia* 5: 92-98.
- Reis, A., C. D. Smart, W. E. Fry, L. A. Maffia y E. S. G. Mizubuti. 2003. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from Southern and Southeastern Brazil from 1998 to 2000. *Plant Disease* 87: 896-900.
- Schumann, G. L. and C. J. D'Arcy. 2000. Late blight of potato and tomato. <http://www.apsnet.org/education/LessonsPlantPath/LateBlight/default.htm> (Consultada junio de 2009)
- Sedegui, M., R. B. Carroll, A. L. Morehart, T. A. Evans, S. H. Kim, R. Lakhdar y A. Arifi. 2000. Genetic structure of the *Phytophthora infestans* population in Morocco. *Plant Disease* 84: 173-176.
- SIACON. 2007. Producción Agrícola Nacional por Entidad Federativa de los años 1980 a 2007. [http://www.oeidrustamaulipas.gob.mx/cd\\_anuario\\_07/siacon19802007wv.html](http://www.oeidrustamaulipas.gob.mx/cd_anuario_07/siacon19802007wv.html) (Consultada enero de 2010).
- Smart, C. D., H. Mayton, E. S. G. Mizubuti, M. R. Willmann y W. E. Fry. 2000. Environmental and genetic factors influencing self-fertility in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 90: 987-994.
- Smith, A. F. 2001. *The tomato in America: early history, culture, and cookery*. University of South Carolina Press, Columbia, S.C, USA. 224 pp.
- Spielman, L. J., A. Drenth, L. C. Davidse, L. J. Sujkowski, W. K. Gu, P. W. Tooley y W.E. Fry. 1991. A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 10: 422-430.

- Spooner, D. M., G. J. Anderson y R. K. Jansen. 1993. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes, and pepinos (solanaceae). *American Journal of Botany* 80 (6): 676-688.
- Stevenson, W. R. 1991. Late blight. En: J. B. Jones, J. P. Jones, R. E. Stall y T. A. Zitter. (Ed). *Compendium of tomato diseases*. The American Phytopathological Society Press. Minnesota. USA. pp. 17
- Suassuna, N. D., L. A. Maffia y E. S. G. Mizubuti. 2004. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 53: 405-413.
- Sujkowski, L. S., S. B. Goodwin, A. T. Dyer y W. E. Fry. 1994. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland. *Phytopathology* 84: 201-207.
- Sujkowski, L. S., B. A. Fry, R. J. Power, S. B. Goodwin, T. L. Peever, R. A. Hamlen y W. E. Fry. 1995. Sensitivities of Mexican isolates of *Phytophthora infestans* to chlorothalonil, cymoxanil and metalaxyl. *Plant Disease* 79: 1117-1120.
- Tigchelaar, E. C. 1991. Botany and culture. En: J. B. Jones, J. P. Jones, R. E. Stall y T. A. Zitter. (Ed). *Compendium of tomato diseases*. The American Phytopathological Society Press. Minnesota. USA. pp. 2
- Tooley, P. W., W. E. Fry y M. J. Villareal González. 1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* populations. *Journal of Heredity*. 76: 431-435.
- Tooley, P. W., C. D. Therrien y D. L. Ritch. 1989. Mating type, race composition, nuclear DNA content, and isozyme analysis of Peruvian isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 79: 478/481.
- Torres, H. 2002. Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú. <http://www.cipotato.org/csd/materials/ContentsHTorres.asp> (Consultada enero de 2011).
- Turkensteen, L. J., W. G. Flier, R. Wanningen y A. Mulder. 2000. Production, survival and infectivity of oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* 49: 688-696.

- Tovar-García, L. E. 2008. Caracterización de poblaciones de *Phytophthora infestans* aisladas de papa y jitomate, para mejorar las estrategias de manejo del tizón tardío. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 41 pp.
- Vargas, A. M., L. M. Quesada-Ocampo, M. C. Céspedes, N. Carreño, A. González, A. Rojas, A. P. Zuluaga, K. Myers, W. E. Fry, P. Jiménez, a. J. Bernal y S. Restrepo. 2009. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Colombia: First Report of the A2 mating type. *Phytopathology* 99: 82-88.
- Wangsomboondee, T., C. T. Groves, P. B., Shoemaker, M. A. Cubeta y J. B. Ristaino. 2002. *Phytophthora infestans* populations from tomato and potato in North Carolina differ in genetic diversity and structure. *Phytopathology* 92:1189-195.
- Widmark, A. K. 2010. The late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. Interaction with the potato plant and Inoculum Sources. Doctoral Thesis. Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Forest Mycology and Pathology Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 67 pp.

## X. ANEXOS

### ANEXO 1

Determinación de haplotipos mitocondriales: Técnica de PCR-RFLP descrita por Griffith y Shaw (1998), con algunas modificaciones.

1. A partir del ADN obtenido mediante el protocolo de Goodwin *et al.* (1992), con modificaciones descritas por Garay Serrano (2005), se amplificaron las regiones P2 y P4 de ADN Mitocondrial, utilizando dos pares de iniciadores: F2/R2 y F4/R4

**F2:** 5'-TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT-3' }  
**R2:** 5'-TTACGGCGGTTTAGCACATACA-3' } **P2**

**F4:** 5'-TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT-3' }  
**R4:** 5'-CCGATACCGATACCAGCACCAA-3' } **P4**

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con un volumen final de 25µl en cada tubo para termociclador. El contenido de cada tubo se detalla a continuación:

| COMPONENTE                           | VOLUMEN (µl) | CONCENTRACIÓN FINAL                                                                      |
|--------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| PCR Master Mix: Hot StarTaq (QIAGEN) | 12.5         | 2.5U Hot StarTaq DNA polimerasa<br>1XPCR Buffer, 200µM dNTPs<br>1.5 mM MgCl <sub>2</sub> |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM) (QIAGEN)    | 2            | 0.5 mM                                                                                   |
| Iniciador F (SIGMA)                  | 0.1          | 0.5 mM                                                                                   |
| Iniciador R (SIGMA)                  | 0.1          | 0.5 mM                                                                                   |
| H2O                                  | 5.3          | _____                                                                                    |
| DNA                                  | 5            | Con una dilución de 1:100                                                                |

El programa del termociclador (Eppendorf AG 22331 Hamburg. 115 V 50-60Hz 500w) que se utilizó para ambas amplificaciones fue prácticamente la misma, únicamente varió la temperatura de alineación. Las condiciones del programa se mencionan a continuación:

| Acción                    | Temperatura               | Tiempo                | ciclos |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 95 °C                     | 15 min.               | 1      |
| Desnaturalización         | 92 °C                     | 30 s.                 | } 35   |
| Alineación                | 57.5 °C (P4) y 62 °C (P2) | 30 s.                 |        |
| Extensión                 | 72 °C                     | 1.10 min              |        |
| Extensión final           | 72 °C                     | 5 min.                | 1      |
| Enfriamiento              | 4 °C                      | Hasta que se necesite |        |

Al finalizar la amplificación, se analizaron 5 µl de producto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 50 V por 90 minutos, para verificar el mismo.

2. Los productos obtenidos fueron digeridos con enzimas de restricción (Promega): La región P2 (1070pb) con *MspI* y la región P4 (964pb) con *EcoRI*. Las reacciones se llevaron a cabo en un tubo de micro-centrífuga de 1.5ml en un volumen final de 20 µl, cuyo contenido se menciona a continuación:

| CONTENIDO                                            | VOLUMEN (µl) |
|------------------------------------------------------|--------------|
| RE 10XBuffer H ( <i>EcoRI</i> ) o B ( <i>MspI</i> )  | 2            |
| BSA                                                  | 0.2          |
| DNA                                                  | 15           |
| H2O                                                  | 1.8          |
| Enzima: <i>EcoRI</i> (12u/µl) o <i>MspI</i> (10u/µl) | 1            |
| TOTAL                                                | 20           |

Los tubos se colocaron en una incubadora a 37°C por 2hrs, para la acción de las enzimas y después a 65°C por 15 minutos para inactivarlas. Los patrones de DNA

digeridos se verificaron por electroforesis con 2.5% de agarosa a 50V/110min. (*EcoRI*) y con 1.5% de agarosa a 50 V/90 min. (*MspI*) y visualizados en un transiluminador de luz UV.

## ANEXO 2.

Patrones de bandeo esperados para cada haplotipo mitocondrial, según Griffth y Shaw (1998):

### **Haplotipo I-a**

EcoRI: 394pb, 361pb y 209pb

MspI: 720pb y 350pb

### **Haplotipo I-b**

EcoRI: 394pb, 361pb y 209pb

MspI: 641pb, 350pb y 79pb

### **Haplotipo II-a**

EcoRI: 603pb y 361pb

MspI: 720pb, 203pb y 147pb

### **Haplotipo II-b**

EcoRI: 603pb y 361pb

MspI: 720pb y 350pb